

JOÃO LUÍS OLIVEIRA GUSMÃO DE ANDRADE

CICATRIZAÇÃO DO CÓLON SEMI-OBSTRUÍDO DE RATOS APÓS
USO DO SILDENAFIL INTRAPERITONEAL OU ORAL

Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

2012

JOÃO LUÍS OLIVEIRA GUSMÃO DE ANDRADE

CICATRIZAÇÃO DO CÓLON SEMI-OBSTRUÍDO DE RATOS APÓS
USO DO SILDENAFIL INTRAPERITONEAL OU ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Duval Araujo

Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

2012

A553a Andrade, João Luís Oliveira Gusmão de
Cicatrização do cólon semi-obstruído de ratos após uso do sildenafil intraperitoneal ou oral/ João Luís Oliveira Gusmão de Andrade. -- Belo Horizonte: 2012.

63 f.

Orientadora: Dra. Ivana Duval Araújo.

Área de concentração: Cicatrização

Linha de pesquisa: Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cicatrização. 2. Anastomose. 3. Colon. 4. Obstrução intestinal. 5. Sildenafil. I. Araújo, Ivana Duval II. Universidade Federal de Minas Gerais.

CDD617

JOÃO LUÍS OLIVEIRA GUSMÃO DE ANDRADE

CICATRIZAÇÃO DO CÓLON SEMI-OBSTRUÍDO DE RATOS APÓS
USO DO SILDENAFIL INTRAPERITONEAL OU ORAL

Dissertação apresentada e defendida perante Comissão Examinadora constituída pelos
Professores:

Prof. Dr. Alberto Schanaider

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Duval Araujo

Belo Horizonte, 05 de setembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA

Profª. Drª Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR

Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profª. Drª Teresa Cristina de Abreu Ferrari

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

SUB- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Profª. Drª Ivana Duval de Araujo

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Profa. Dr^a Ivana Duval de Araujo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral - representante discente

A DEUS, princípio gerador e consubstanciador de
todas as coisas, fonte das minhas forças,
proteção e inspiração.

Aos meus pais, Dilson e Devanice,
exemplos de vida, coragem e modelo de
família.

À minha esposa Poliana pelo amor,
devoção, e pelo tempo que nos privamos.

À minha Cibele, tão pequenina mas que
já ocupa um grande lugar na família.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dr^a Ivana Duval Araujo** pelo aprendizado, apoio e pela honra dessa orientação.

Ao acadêmico da faculdade de medicina da UFMG **Claudio Alvarenga Campos** pelo companheirismo e dedicação.

Aos companheiros **Dr. Paulo Roberto Rodrigues Bicalho, Dr. Emerson Ramos Lopes e Dr. Daniel Gomes de Alvarenga** pelo apoio e horas de trabalho juntos.

Ao médico veterinário **Dr. João Efrain**, pela atenção e disposição.

Aos colegas de equipe cirúrgica e amigos **Dr. João Douglas Nico, Dr. Eduardo Sá Amaral e Dr. Emerson Silveira**, pela paciência e solidariedade nos meus momentos de ausência.

Ao amigo e **colega de IML Dr. Alexandre Xavier** pelo companheirismo e cumplicidade nessa labuta.

Aos amigos do **Hospital Samaritano, Hospital Municipal e SAMU** pelo apoio, compreensão e trocas de plantões.

Aos funcionários do biotério da UFMG pela constante disponibilidade.

Aos preceptores, companheiros de residência e amigos do Hospital do IPSEMG onde iniciei no aprendizado da arte cirúrgica.

Aos preceptores, companheiros de residência e amigos do Hospital das Clínicas da UFMG onde continuei o meu aprendizado e lapidação do meu ofício.

*"Que os vossos esforços
desafiem as impossibilidades"*

Charles Chaplin

Dramaturgo:1889 - 1977

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIACÕES e SIGLAS	XII
1. RESUMO.....	XIII
2. ABSTRACT.....	XIV
3. INTRODUÇÃO.....	01
4. OBJETIVOS.....	03
5. RELEVÂNCIA.....	04
6. METODOLOGIA.....	05
6.1 animais utilizados e cuidados dispensados.....	05
6.2 Desenho experimental.....	05
6.3 Anestesia e técnica operatória.....	06
6.3 1 Obstrução intestinal.....	06
6.3 2 Anastomose intestinal.....	07
6.3.3 Administração do sildenafil.....	07
6.4 Cuidados Pós-operatórios.....	08
6.5 Avaliação da cicatrização.....	09
6.5.1 Avaliação macroscópica.....	09
6.5.2 Avaliação da pressão de ruptura.....	09
6.5.3 Avaliação histológica.....	10
6.6 Análise estatística.....	15
7. RESULTADOS.....	16
7.1 Animais.....	16
7.2 Análise macroscópica.....	16
7.3 Pressão de ruptura.....	17
7.4 Análise histológica.....	18
8. DISCUSSÃO.....	22
9. CONCLUSÃO.....	29
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
11. ANEXOS.....	35

LISTA DE FIGURAS

<i>Fig. 1 Método de realização da semi-obstrução colônica: Ligadura do cólon transverso (seta verde) com fio de seda (seta vermelha) contra cateter de nelaton (seta azul). No detalhe (A), resultado final do procedimento</i>	07
<i>Fig. 2 Aspecto da anastomose so segmento obstruído do cólon transverso de ratos com pontos separados de poliglactina 5-0 (seta)</i>	08
<i>Fig. 3 Sistema para medida da pressão de ruptura.....</i>	10
<i>Fig. 4 Fotomicrografia do infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil, classificado como discreto (A) ou acentuado (B) em aumento de 400 x</i>	11
<i>Fig. 5 Fotomicrografia do aspecto histológico da angiogênese leve (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 200 x)</i>	12
<i>Fig. 6 Fotomicrografia do aspecto histológico da angiogênese acentuada (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 200 x)</i>	12
<i>Fig. 7 Fotomicrografia da concentração de fibras colágenas (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil, classificado como leve (A) ou acentuada (B), em aumento de 200 x</i>	13
<i>Fig. 8 Fotomicrografia da aspecto histológico de fibras colágenas finas, tortuosas, características de fibras colágenas imaturas, (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 400 x)</i>	14
<i>Fig. 9 Fotomicrografia da aspecto histológico de fibras colágenas espessas, retificadas, características de fibras colágenas maduras, (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 400 x).....</i>	14
<i>Fig. 10 Percentual de estenose da anastomose avaliadas no sétimo dia pós-operatório em animais com obstrução colônica e construção de anastomoses após nenhum tratamento (OBS) ou tratamento com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO)</i>	17
<i>Fig. 11 Média do valor, em mmHg, da pressão de ruptura, ao sétimo dia pós-operatório, de anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO)</i>	18
<i>Fig. 12 Média da contagem de polimorfonucleares neutrófilos na submucosa da região das anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO)</i>	19
<i>Fig. 13 Média da contagem de fibras colágenas (total, fibras imaturas e fibras maduras) na região das anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO)</i>	21

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

°C – graus centígrados

CETEA/UFMG – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais

cm - centímetro

g - grama

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IM - intramuscular

IP - intraperitoneal

Kg - quilograma

Ltda. - limitada

mg - miligrama

ml - mililitro

mmHg – milímetros de mercúrio

MP – metaloproteinase

MP8 – metaloproteinase8

n – número de animais

OBS – grupo obstrução colônica

p – nível de significância

PDE-5 – fosfodiesterase 5

PMN – polimorfonucleares

PVPI – polivinilpirrolidona iodo

SC - subcutâneo

SIP – grupo sildenafil intra peritoneal

SP – São Paulo

SVO – grupo sildenafil por via oral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USA – United States of America (Estados Unidos da América)

VO – via oral

1. RESUMO

INTRODUÇÃO: A anastomose realizada no tratamento do cólon obstruído apresenta maior incidência de fístulas, com aumento da morbidade e mortalidade no pós-operatório. Acredita-se que isso ocorra devido a alterações da parede do segmento intestinal como edema ou alterações da microcirculação, e tem-se buscado medidas que possam reduzir os efeitos deletérios da obstrução intestinal na cicatrização das anastomoses. **OBJETIVO:** avaliar a cicatrização do cólon esquerdo de ratos em presença de semiobstrução intestinal após uso do sildenafil oral ou tópico. **METODOLOGIA:** Estudaram-se 17 ratos wistar fêmeas distribuídas em três grupos: Não tratados (n=6), obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária; Sildenafil tópico (n=5), obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária e irrigação da cavidade com sildenafil ao final da cirurgia; Sildenafil oral (n=6), obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária e administração de sildenafil oral por gavagem gástrica ao final da cirurgia. A obstrução colônica foi feita através de ligadura do cólon com fio de seda 2-0 contra um cateter com o objetivo de criar um estreitamento abrupto da luz colônica, permitindo a passagem de gases. Após 24 horas, foi feita ressecção da área da obstrução e realizada a anastomose. Os animais foram mortos no sétimo dia após a anastomose e avaliados a presença de fístula à macroscopia, a pressão de ruptura e a angiogênese à microscopia. **RESULTADOS:** Os grupos que receberam sildenafil IP e VO tiveram valores de pressão de ruptura maiores que o grupo não tratado. Houve também aumento da angiogênese nos animais tratados com sildenafil IP quando comparados aos animais do grupo não tratado e do grupo tratado com sildenafil VO. **CONCLUSÃO:** O uso do sildenafil foi capaz de estimular a cicatrização do cólon semiobstruído em ratos.

PALAVRAS CHAVE: Cicatrização; Anastomose; Colon; Obstrução intestinal; Sildenafil.

2. ABSTRACT

INTRODUCTION: Anastomosis held treatment in obstructed colon presents higher incidence of fistula, with increased post-operative morbidity and mortality. It is believed that this occurs due to changes in the wall of the bowel segment as edema or changes of microcirculation, and has been studied treatments which may reduce the deleterious effects of intestinal obstruction in healing of anastomosis. **OBJECTIVE:** To evaluate the healing of left colon in rats in presence of bowel obstruction after use of oral or topic sildenafil. **METHODOLOGY:** There were studied 17 females wistar rats distributed into three groups: untreated (n = 6), colonic obstruction, colonic resection, primary anastomosis; Sildenafil topic (n = 5), colonic obstruction, colonic resection, primary anastomosis and peritoneal irrigation with sildenafil at the end of surgery; Oral Sildenafil (n = 6), colonic obstruction, colonic resection and primary anastomosis, administration of oral sildenafil by gastric gavage at the end of surgery. The colonic obstruction was done through colonic ligation with 2-0 silk against a catheter with the goal of creating an abrupt narrowing of colonic lumen, allowing passage of gas. After 24 hours, there was made resection of the silk-ligated area and held the colonic anastomosis. The animals were killed on the seventh day after the anastomosis and evaluated for the presence of the fistula, bursting pressure and angiogenesis at microscopy. **RESULTS:** The groups that have received sildenafil IP and VO presented increase in bursting pressure when compared with untreated group. There was also increased angiogenesis in animals treated with sildenafil IP when compared to animals not treated and the group treated with sildenafil VO. **CONCLUSION:** The use of sildenafil was able to stimulate the healing of obstructed colon in rats

KEYWORDS: Healing; Anastomosis; Colon; Intestinal obstruction; Sildenafil

3. INTRODUÇÃO

A obstrução do cólon é causa relativamente comum de urgências abdominais cirúrgicas, e a obstrução do cólon esquerdo é um problema cirúrgico real.^{1,2} Seu tratamento é motivo de controvérsia em relação à confecção de anastomoses primárias ou após realização de colostomias, mas recentemente tem sido proposta a ressecção e anastomose primária em casos de obstrução intestinal. A alta incidência de deiscência de suturas no cólon obstruído, quando a anastomose é realizada primariamente, faz com que a realização de colostomias proximais à oclusão seja uma alternativa segura no tratamento de pacientes com essa afecção, por acreditar-se que as ressecções acompanhadas de anastomoses em segmentos intestinais acentuadamente distendidos aumentam o risco de complicações, principalmente a ocorrência de fístulas anastomóticas, que são as complicações de maior gravidade desses pacientes^{3,4}.

A cicatrização das anastomoses pode ser negativamente influenciada por diversos fatores locais e sistêmicos. Vários estudos mostraram que a desnutrição, a deficiência de proteínas, a carência de vitaminas, a anemia grave, a isquemia, o diabetes, entre outros, podem ser danosos à cicatrização das anastomoses intestinais, e nos casos onde há obstrução intestinal essa atua como um fator capaz de interferir negativamente na cicatrização. A presença da obstrução colônica pode se associar a hipóxia secundária à distensão da alça, favorecendo também a passagem de bactérias da luz para a parede intestinal^{5,6}.

Nas anastomoses realizadas em presença de obstrução intestinal, têm sido avaliados diversos fatores adjuvantes da cicatrização como eritropoietina⁷, membrana amniótica⁸, irrigação com aminoácidos⁹, solução salina¹⁰ e, com o objetivo de tentar aumentar o influxo de sangue, tem sido relatado o uso do Bosentan¹¹, Resveratrol¹² e, principalmente, inibidores da fosfodiesterase cinco (PDE - 5)¹³, sendo que o sildenafil, um potente e específico inibidor da PDE-5, teve o seu uso testado para vários fins como hipertensão pulmonar¹⁴, neurogênese¹⁴, doença de Alzheimer¹⁴, e

principalmente nos processos cicatriciais de retalhos cutâneos ^{15,16,17}, anastomoses intestinais ^{18,13} e aderências ¹⁹.

É então possível que o uso de sildenafil possa atuar como um modulador positivo na cicatrização de anastomoses em alças colônicas obstruídas, por talvez atuar como estimulador da neoangiogênese. Portanto, foi objetivo deste estudo avaliar o possível efeito benéfico do sildenafil na cicatrização do cólon obstruído de ratos.

4. OBJETIVO

Avaliar a cicatrização de anastomose no cólon esquerdo, em ratos com semi-obstrução intestinal após uso do sildenafil oral e intraperitoneal, por meio de parâmetros histopatológicos e da pressão de ruptura.

5. RELEVÂNCIA:

A fístula anastomótica permanece como principal causa de morbidade e mortalidade após ressecções intestinais. Portanto, a busca por métodos ou agentes capazes de reduzir sua incidência, especialmente quando feita em condições adversas, justifica pesquisas experimentais e clínicas que possibilitem a atuação preventiva no processo cicatricial para melhoria dos resultados.

6. MÉTODOS:

6.1 Animais utilizados e cuidados dispensados

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com protocolo 060/09. Foram estudados 17 ratos Wistar fêmeas de três a quatro meses de vida e peso médio de 300 g. Os animais foram procedentes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e acomodados no depósito de pequenos animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por pelo menos 15 dias antes da experimentação. Todos os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas (no máximo seis animais por gaiola), dimensão 20x30x45 cm, de poliuretano com tampas de aço inoxidável, forradas com serragem de madeira branca e atóxica. O recipiente para água era graduado, de polietileno e atóxico. As gaiolas foram colocadas em ambiente seco, à temperatura ambiente com oferta livre de água e ração comercial padrão.

6.2 Desenho experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Não tratados (OBS, n=6): Obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária;
- Sildenafil tópico (SIP, n=5): Obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária e irrigação da cavidade com sildenafil (um mg/Kg) ao final da cirurgia;

- Sildenafil oral (SVO, n=6): Obstrução colônica, ressecção colônica, anastomose primária e administração de sildenafil oral (um mg/kg) por gavagem gástrica ao final da cirurgia.

6.3 Anestesia e técnica operatória

6.3.1 Obstrução intestinal

Os animais foram anestesiados com quetamina, 60 mg/Kg/dose (Cristália Prod. Quim Farmac Ltda. Itapira SP) e xilazina, 10 mg/Kg/dose (Schering-Plough, Cotia SP) aplicadas por injeção intraperitoneal, (IP). Uma vez anestesiado, foram ministrados a todos os animais 30mg/Kg de Ceftriaxona (ROCEPHIN, Roche), por via intramuscular (IM). Depois de alcançado o plano anestésico, os animais foram posicionados em placa de cortiça em decúbito dorsal e imobilizados através da contenção das patas e da cauda com fita adesiva. Foi realizada tricotomia de toda a parede abdominal anterior e antissepsia da região depilada com solução de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) degermante 10%. Os animais foram submetidos a laparotomia mediana e realizada a obstrução colônica. Para tal, identificou-se o ângulo esplênico do cólon transverso, e a partir desta referência anatômica identificado o segmento de cólon a 2 cm distal desta referência que foi ligado contra um cateter de nelaton número 12 com fio de seda 2-0 (Fig. 1). Em seguida, foi feita a laparorráfia em dois planos de chuleio contínuo de poliglactina 3-0, administrado analgésico (buprenorfina 0,03 mg/Kg SC duas vezes ao dia), e o animal retornado para sua gaiola de origem, com livre acesso a água e alimentos, sendo observado durante 24 horas.

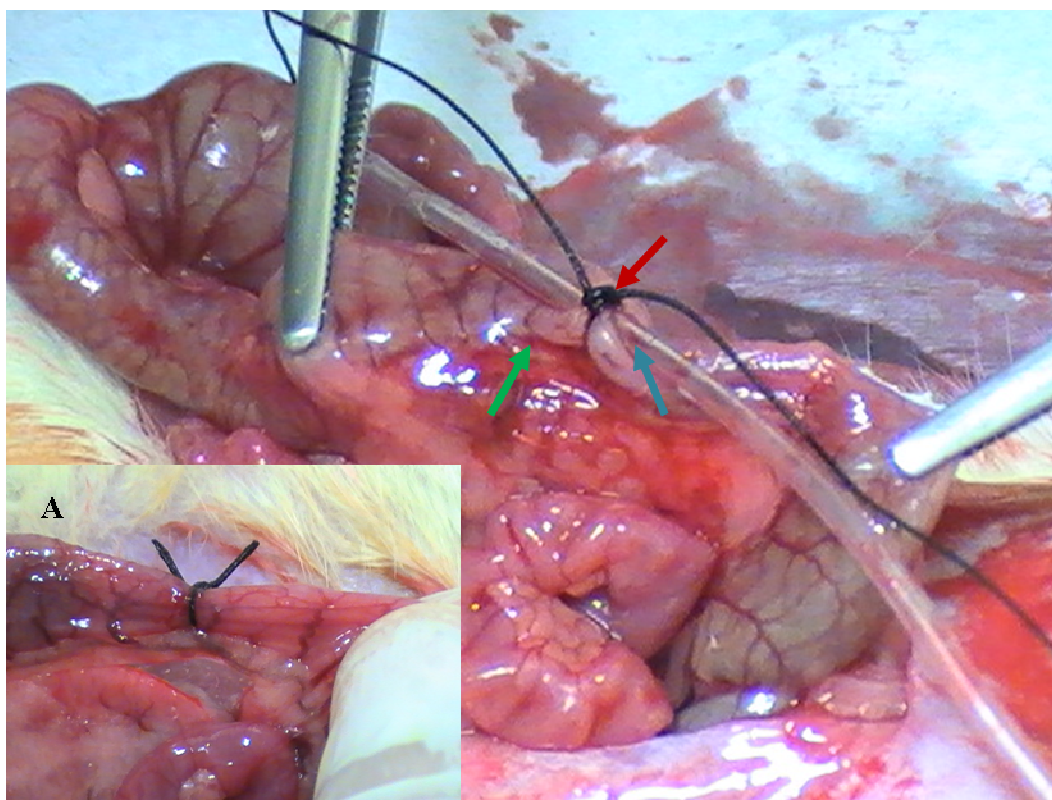


Fig 1—Método de realização da semi-obstrução colônica: Ligadura do cólon transverso (seta verde) com fio de seda (seta vermelha) contra cateter de nelaton (seta azul). No detalhe (A), resultado final do procedimento

6.3.2 Anastomose intestinal

Após 24 horas da indução da obstrução colônica, foi feita nova anestesia e administração das mesmas drogas anestésicas do item anterior por via intraperitoneal, em seguida reabertura da cavidade abdominal com ressecção de segmento com cerca de 5 mm do cólon centralizado onde foi feita a ligadura, e anastomose das bordas resultantes com sutura invertente de pontos separados de poliglactina 5-0 (Fig. 2). Em seguida, foi feita lavagem da cavidade peritoneal por três vezes com 15 ml de solução salina a 0,9% mantida a temperatura de 38°C e o abdome fechado em dois planos, sendo o primeiro plano, músculo-aponeurótico, com sutura contínua com poliglactina 3-0 e o segundo plano, pele, com pontos separados de seda 4-0.

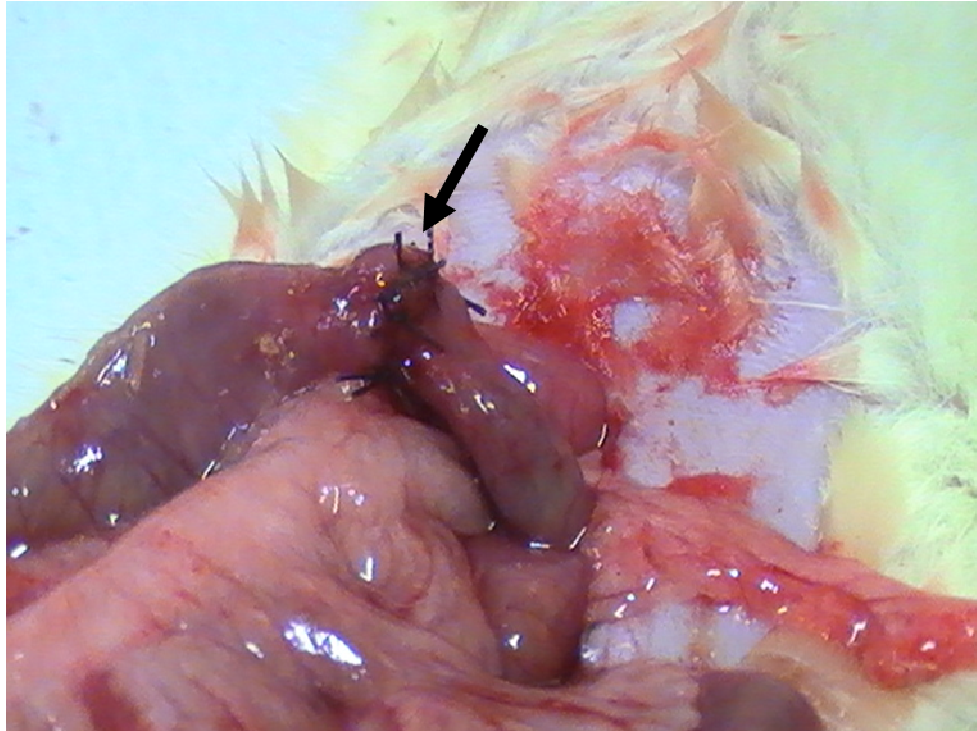


Fig. 2 Aspecto da anastomose no segmento obstruído do cólon transverso de ratos com pontos separados de poliglactina 5-0 (seta)

6.3.3 Administração do sildenafil

Foi utilizado no experimento solução de sildenafil na concentração de 0,1 mg/ml. No grupo de administração oral, ao final da cirurgia e após recuperação anestésica, foi feita gavagem gástrica com cateter de nelaton número seis e administração de dose única de sildenafil um mg/kg. No grupo de uso tópico, após a confecção da anastomose foi feita infusão na cavidade peritoneal da solução de sildenafil (um mg/kg) após fechamento da parede abdominal.

6.4 Cuidados pós-operatórios

Após a confecção das anastomoses, os animais foram alocados em suas gaiolas de origem e receberam somente solução de glicose a 25% nas primeiras 24 horas de pós-operatório. Todos os animais foram medicados com buprenorfina (0,03 mg/Kg subcutâneo (SC) duas vezes ao dia por três dias) e ceftriaxona (30 mg/Kg IM) uma vez ao dia. .

6.5 Avaliação da cicatrização

Os animais foram avaliados no sétimo dia pós-operatório. Após anestesia com a técnica anteriormente descrita, foi feita nova laparotomia, avaliados parâmetros macroscópicos e os animais eutanasiados por exsanguinação. Segmentos do cólon foram retirados para estudo da pressão de ruptura e avaliação microscópica da anastomose. Os dados foram anotados em planilha do Microsoft Office Excel 2003-2007 (Microsoft Corporation, California USA).

6.5.1 Avaliação macroscópica

Após a eutanásia, foi feita nova laparotomia e parâmetros macroscópicos relativos a estenose da anastomose e fístulas anastomóticas foram avaliada. A estenose da anastomose foi classificada como grau I (discreta dilatação, inferior a uma vez e meia o diâmetro a jusante), grau II (moderada dilatação, entre uma vez e meia e duas vezes o diâmetro a jusante) ou grau III (dilatação considerável, maior do que duas vezes o diâmetro a jusante).²⁰ Os dados foram agrupados em ausentes (graus I) ou presentes (graus II e III). Os sinais de fístulas anastomóticas como abscesso ou peritonite foram considerados como presentes ou ausentes.

Após a análise macroscópica, segmentos do cólon compreendendo no ponto central da anastomose foram removidos para estudo da pressão de ruptura e a avaliação microscópica dos parâmetros de cicatrização.

6.5.2 Avaliação da pressão de ruptura

Um segmento colônico de oito centímetros, tendo em seu ponto central a anastomose, foi removido com suas aderências para estudo da pressão de ruptura conforme técnica padronizada em nosso meio^{21,22,20}. A pressão de ruptura, em mmHg, foi avaliada através de insuflação de ar em uma das extremidades, sob fluxo constante,

estando a peça imersa em uma cuba contendo solução salina a 0,9%, e a outra extremidade ligada com fio de seda 2.0 e obstruída por uma pinça a jusante. O cateter através do qual o ar foi insuflado conectou-se também a um manômetro aneróide por uma conexão em “U”, fornecendo a pressão exercida na anastomose de 10 a 10 mmHg (Fig. 3). A medida da pressão de ruptura foi dada pelo valor registrado no momento da ruptura da alça, verificado pela presença do borbulhamento do líquido contido na cuba.



Figura 3 – Sistema para medida da pressão de ruptura

6.5.3 Avaliação histológica

Os segmentos de cólon com a anastomose foram colocados em frascos contendo formol a 10%, incluídos em parafina e feitos cortes histológicos com 4 μ corados com hematoxilina/eosina e tricrômico de Gomori. Essas lâminas foram avaliadas de modo duplo-desconhecido por um único patologista em microscópio

óptico (Nikon Alphaphot-2-Tóquio-Japão), sendo feitas avaliações da inflamação, da angiogênese e da fibroplasia.

Inflamação: A submucosa do cólon foi avaliada qualitativamente e quantitativamente. Na análise qualitativa, a inflamação foi classificada como 1+ (ausente), 2+ (discreto), 3+ (moderada) ou 4+ (acentuada), como mostrado na figura 4. Para efeito de análise estatística, as amostras classificadas como 1+ ou 2+ foram agrupadas em ausente e 3+ e 4+ como presente. Também foi feita histomorfometria, com contagem de polimorfonucleares leucócitos na submucosa em 20 campos aleatórios.

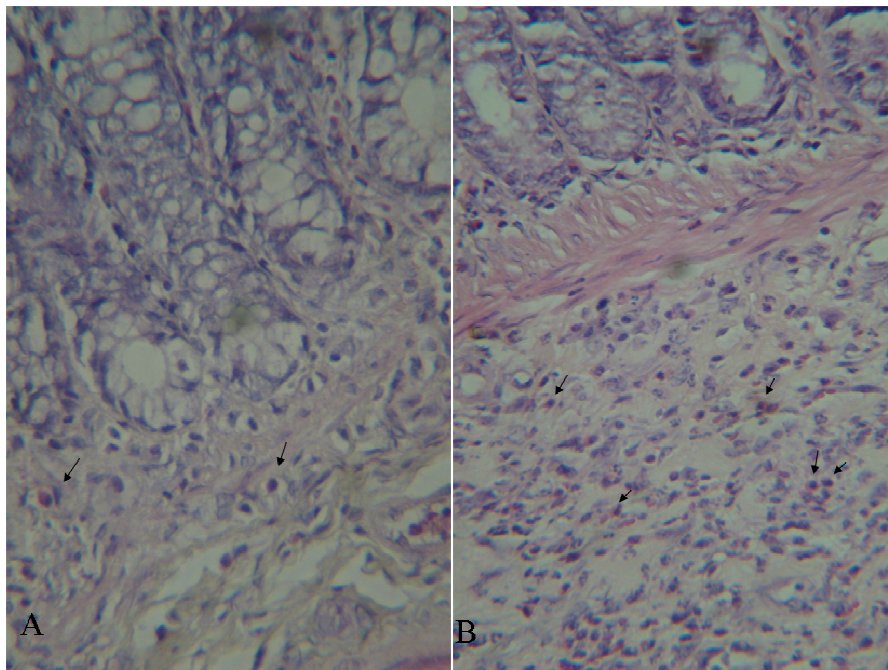


Fig. 4 Fotomicrografia do infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil, classificado como discreto (A) ou acentuado (B) em aumento de 400 x

Angiogênese: Foi feita a avaliação do grau de angiogênese, classificada como ausente (1+), discreta (2+), moderada (3+) e acentuada (4+). Para comparação entre os grupos, essas alterações foram categorizadas como ausente (1+ e 2+. Fig. 5) ou presente (3+ e 4+. Fig. 6).

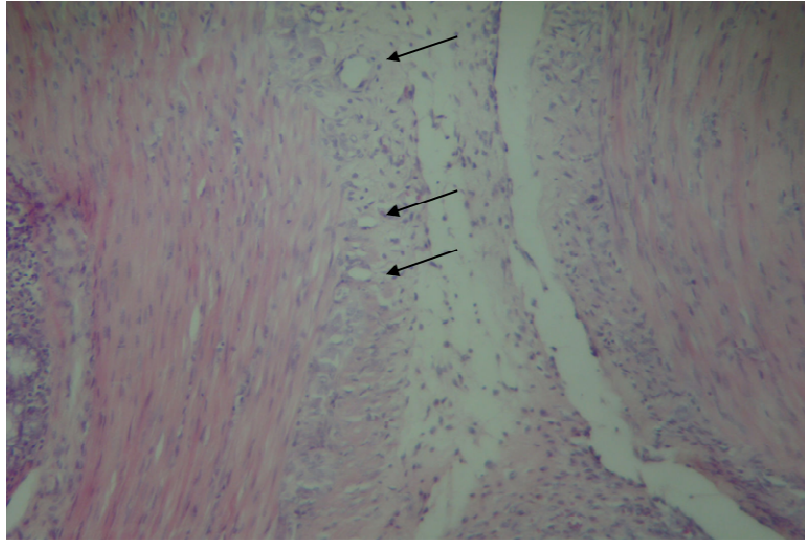


Fig. 5 Fotomicrografia da aspecto histológico da angiogênese leve (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 200 x)

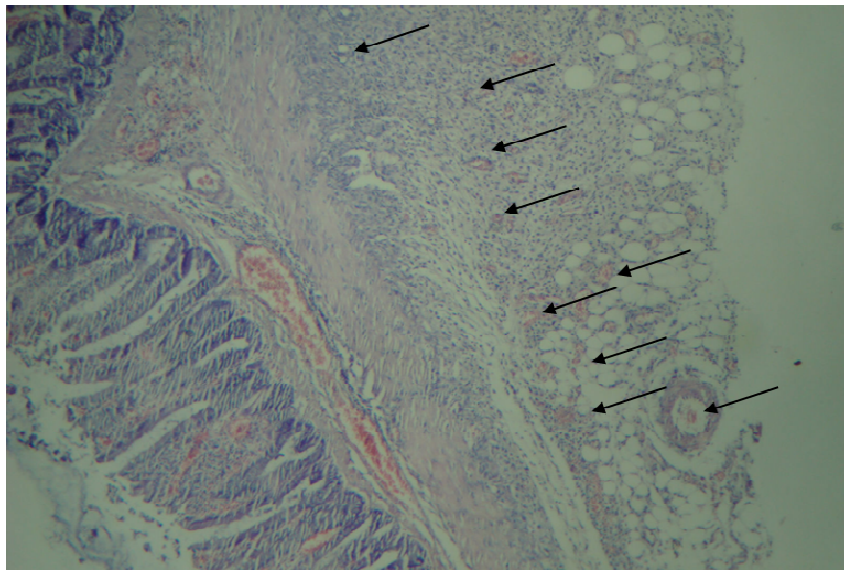


Fig. 6 Fotomicrografia da aspecto histológico da angiogênese acentuada (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 200 x)

Fibroplasia: Para avaliar a fibroplasia foi feita avaliação qualitativa e quantitativa de fibras colágenas nas lâminas coradas pelo tricromico de Gomori. As

fibras imaturas e maduras foram classificadas em ausente (nenhuma fibra), leve (até 10 fibras por campo), moderado (10 a 20 fibras por campo) e acentuado (mais de 20 fibras por campo), como observado na figura 7. Também foi feita contagem do o número de fibras imaturas (Fig. 8) e maduras (Fig. 9) em 20 campos aleatórios e calculado o número médio do total de fibras e de cada tipo de fibra na submucosa do cólon.

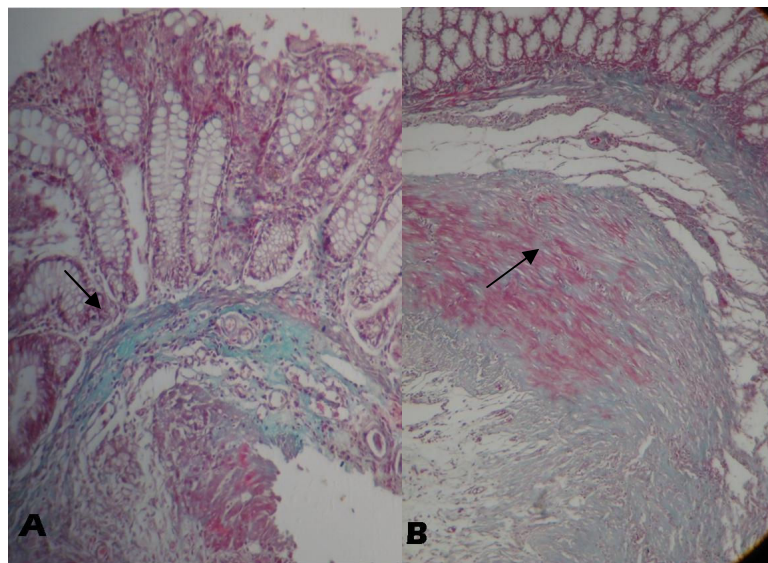


Fig. 7 Fotomicrografia da concentração de fibras colágenas (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil, classificado como leve (A) ou acentuada (B), em aumento de 200 x

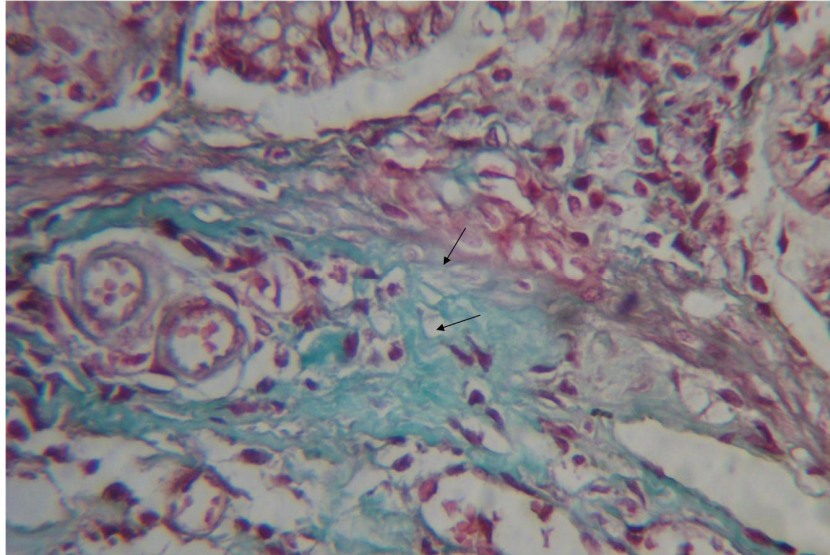


Fig. 8 Fotomicrografia da aspecto histológico de fibras colágenas finas, tortuosas, características de fibras colágenas imaturas, (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 400 x)

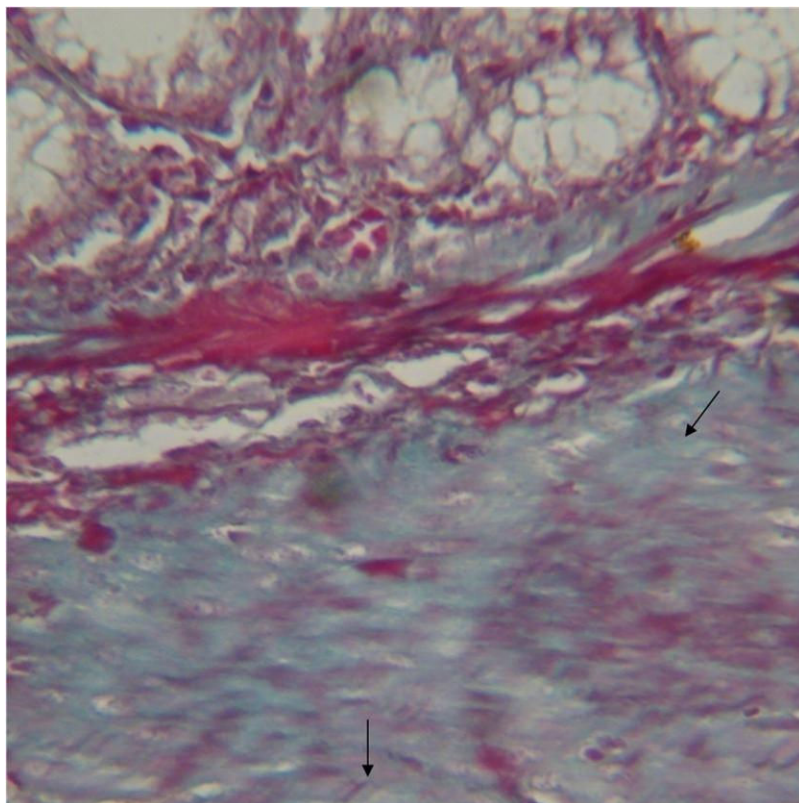


Fig. 9 Fotomicrografia da aspecto histológico de fibras colágenas espessas, retificadas, características de fibras colágenas maduras, (seta) na submucosa do cólon obstruído de ratos tratados ou não com o sildenafil (aumento de 400 x)

6.6 Análise estatística

Os dados qualitativos foram comparados entre os grupos através do teste do Qui-quadrado com correção de Fisher. Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos através do teste de Mann-Whitney. Foi considerado em ambos os testes diferenças ao nível de 5%. Foram utilizados os pacotes estatísticos Assistat 7.6 beta® e Epi-info®

7. RESULTADOS:

7.1 Animais

A média de peso dos animais foi $328,3 \pm 9,8$ gramas no grupo com obstrução colônica e confecção da anastomose sem tratamento adicional (OBS), $288,0 \pm 42,7$ gramas naqueles animais com obstrução colônica e onde foi feito o tratamento com sildenafil tópico após a anastomose intestinal (SIP), e $300,0 \pm 46,1$ gramas nos animais com obstrução colônica onde foi feita a anastomose e tratamento com sildenafil por via oral (SVO). O percentual de perda de peso no pós-operatório foi de $8,5 \pm 2,6$ % no grupo onde foi feita anastomose colônica após obstrução, $8,2 \pm 2,5$ % no grupo tratado com sildenafil por via intraperitoneal e $9,5 \pm 3,3$ % no grupo tratado com sildenafil por via oral, sem diferença significativa entre os grupos.

7.2 Análise macroscópica

A análise macroscópica da região das anastomoses não mostrou, em nenhum animal, fístula identificável à macroscópica, seja tamponada ou para cavidade livre. A estenose da anastomose classificada como II ou III ocorreu em 4 animais do grupo não tratado (66,7%), com redução nos animais tratados com sildenafil VO (16,7%, $p=0,04$) ou sildenafil IP (20%, $p=0,06$. Fig. 10).

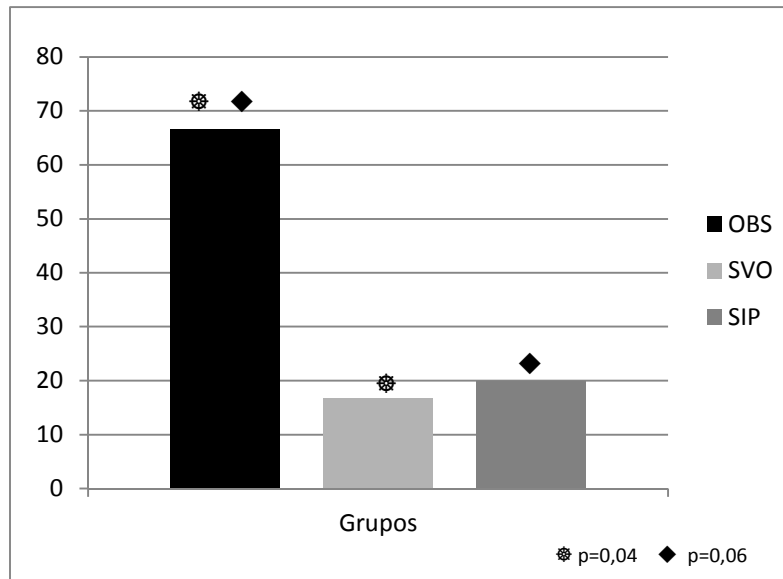


Fig. 10 Percentual de estenose da anastomose avaliadas no sétimo dia pós-operatório em animais com obstrução colônica e construção de anastomoses após nenhum tratamento (OBS) ou tratamento com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO).

7.3 Pressão de ruptura

O teste da pressão de ruptura mostrou valor médio de, $155,0 \pm 30,2$ mmHg no grupo com obstrução colônica, $250,0 \pm 64,0$ no grupo com obstrução tratado com sildenafil IP e $216,7 \pm 15,1$ no grupo com obstrução tratado com sildenafil VO. Houve aumento significativo da pressão de ruptura na anastomose do cólon de animais onde foi feito tratamento com sildenafil IP ($p=0,002$), e sildenafil VO ($p=0,001$), como visto na figura 11.

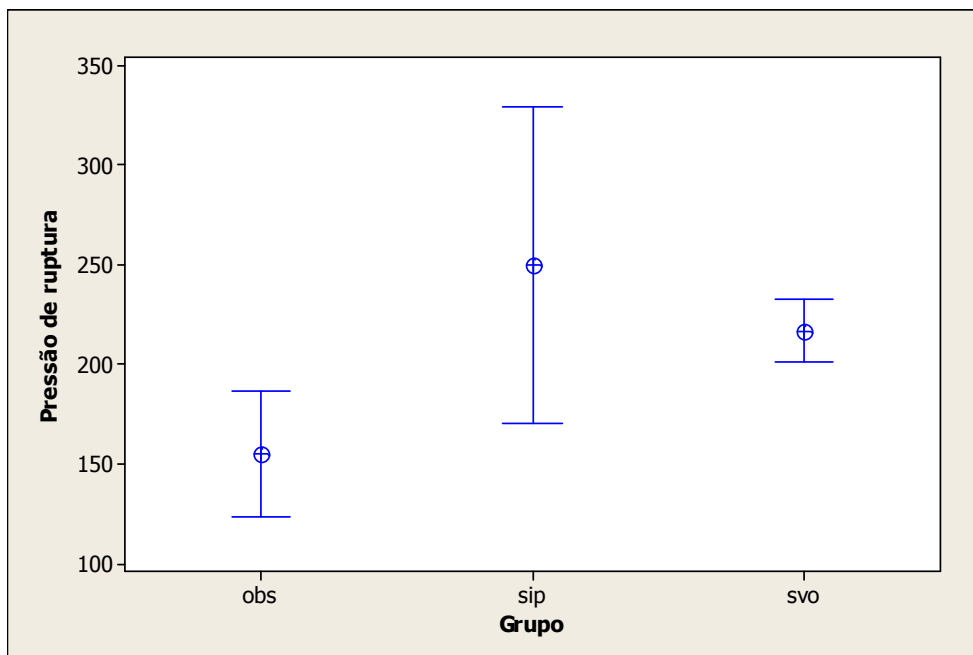


Fig. 11 Média do valor, em mmHg, da pressão de ruptura, ao sétimo dia pós-operatório, de anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO).

7.4 Análise histológica

A média do número de neutrófilos por campo no grupo de animais com obstrução foi de $40,6 \pm 2,65$ no grupo com obstrução colônica, $42,44 \pm 7,96$ no grupo obstruído e tratado com sildenafil por via intraperitoneal e $51,90 \pm 5,09$ polimorfonucleares por campo na submucosa dos animais do grupo com obstrução colônica tratados com sildenafil por via oral. Não houve diferença significativa quando comparados os animais dos três grupos avaliados (Fig. 12). A angiogênese classificada como acentuada (4+) foi vista em 3 animais do grupo sildenafil e em nenhum dos outros grupos com $p = 0,03$.

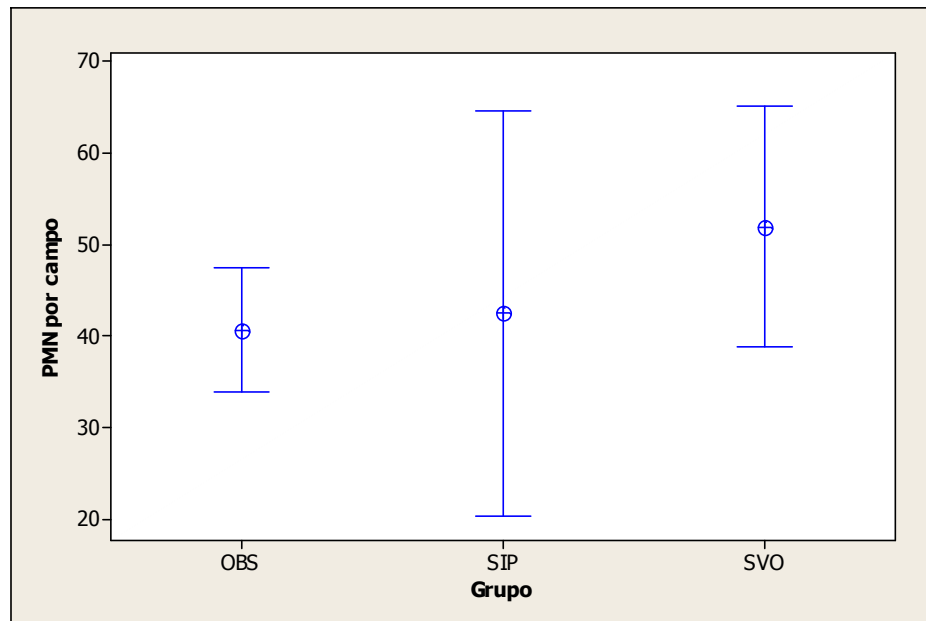


Fig. 12 Média da contagem de polimorfonucleares neutrófilos na submucosa da região das anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO).

A presença de fibras colágenas classificadas como acentuada (mais de 20 fibras por campo) ocorreu em 5 animais no grupo OBS (83,3%), todos os 5 animais do grupo SIP (100%), bem como todos também do grupo SVO (6 animais, 100%). Qualitativamente também, a presença de fibras colágenas jovens classificada como acentuada foi vistas em dois dos animais do grupo OBS, três animais no grupo SIP e três animais do grupo SVO. A quantidade de fibras colágenas maduras foi classificada como discreta em cinco dos seis animais do grupo OBS, todos os cinco animais do grupo SIP e quatro de seis animais do grupo SVO, sem diferença significativa entre os grupos.

O número médio de fibras colágenas (imaturas ou maduras) por campo foi de $25,33 \pm 2,35$ fibras no grupo obstruído, $30,6 \pm 1,6$ fibras no grupo obstruído e tratado com sildenafil IP e $27,67 \pm 1,94$ no grupo obstruído e tratado com sildenafil VO. Houve maior número de fibras colágenas no grupo de animais tratados com sildenafil IP quando comparados àqueles não tratados ($p=0,04$. Fig. 13), mas não quando

comparados animais tratados com sildenafil VO e animais do grupo OBS (obstrução colônica sem tratamento)

A contagem de fibras colágenas finas, imaturas, na submucosa dos animais com obstrução colônica e não tratados foi de $16,83 \pm 1,90$. Nos animais obstruídos e tratados com sildenafil IP foi de $22,20 \pm 1,83$, e naqueles com obstrução colônica e tratados com sildenafil VO a média de fibras colágenas jovens na submucosa foi de $18,17 \pm 1,22$ (Fig. 13). Quando comparados com animais com obstrução colônica e não tratados, houve aumento significativo do número dessas fibras nos animais tratados com sildenafil IP ($p=0,03$), mas não quando se comparou os animais não tratados e aqueles tratados com sildenafil VO.

A média de fibras colágenas maduras na submucosa do cólon de animais onde a anastomose foi feita após obstrução colônica, e não foi feito tratamento adicional, foi de $8,5 \pm 1,06$ fibras por campo. Nos grupos tratados com sildenafil, quando foi feita administração IP a média foi de $8,4 \pm 1,12$ fibras e quando o tratamento foi feito por via oral (VO) a média encontrada foi de $9,5 \pm 1,36$ fibras por campo de grande aumento (Fig. 13). Não houve diferença significativa quando comparados os dois tratamentos (sildenafil IP ou VO) com o grupo de animais não tratados.

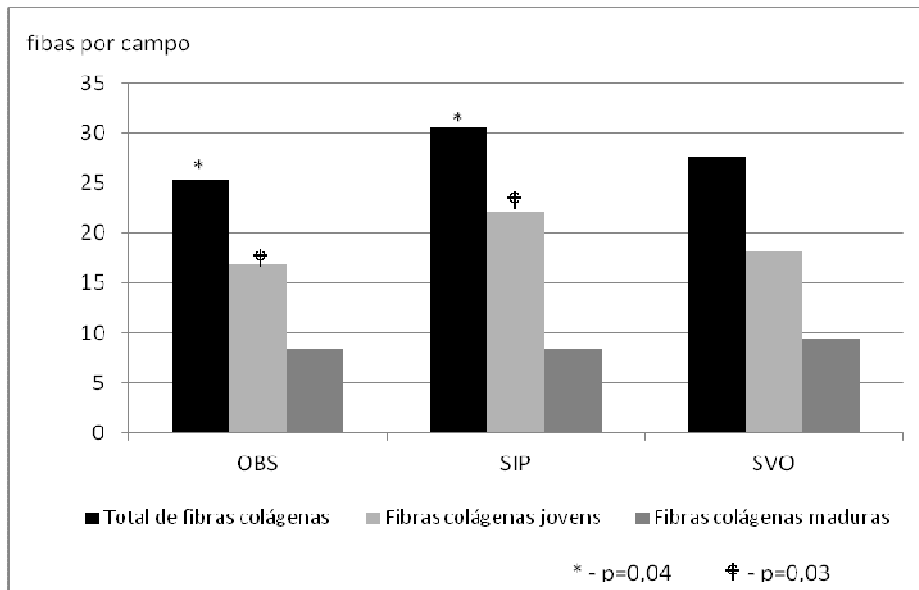


Fig. 13 Média da contagem de fibras colágenas (total, fibras imaturas e fibras maduras) na região das anastomoses do cólon de ratos wistar após obstrução do cólon e não tratados (OBS) ou tratados com sildenafil IP (SIP) ou sildenafil VO (SVO)

8. DISCUSSÃO:

As anastomoses intestinais estão entre os procedimentos cirúrgicos mais realizados na cirurgia geral, e a falha da cicatrização é causa de fístulas, que ocorrem entre 0,5% a 30% das operações realizadas, associando-se a aumento da morbidade e mortalidade. Entre suas várias etiologias estão a hipóxia, a infecção, além de outros fatores locais e sistêmicos ^{1,2}. Várias condições estão associadas com a evolução desfavorável das anastomoses realizadas no cólon obstruído como a própria distensão do cólon, edema, baixa tensão de oxigênio e pH intraluminal alcalino ²³. Dentre esses mecanismos, a hipóxia tecidual, como observado em alguns modelos experimentais, ocorre pelo mecanismo onde a oclusão intestinal causa acúmulo de gás e líquido na luz intestinal à montante e diminuição de peristaltismo a jusante. A distensão intestinal promove aumento das pressões intramural e intraluminal, com redução da perfusão intestinal. Quando a pressão intraluminal se iguala à pressão arterial, ocorre hipóxia da alça, com consequente aumento da permeabilidade da parede intestinal devido ao aparecimento de microporos em sua parede, através dos quais passam água e íons. A progressão do quadro leva ao aumento progressivo da isquemia, que culmina com a necrose da parede e passagem do conteúdo para o peritônio. ^{6,10,4}

Portanto, foi objetivo deste estudo avaliar a ação de um medicamento com provável efeito estimulador da angiogênese na cicatrização de anastomose do cólon com hipóxia por estase venosa e edema, considerando também essa como uma anastomose de risco. Outros autores, empregando a oclusão total do cólon ¹⁵ enfatizam que a redução abrupta da luz colônica, com dilatação a montante, estase venosa e edema da parede intestinal, é capaz de reduzir a oxigenação na microcirculação, permitindo ainda a passagem de bactérias da luz intestinal para a submucosa ⁵, com acentuada reação inflamatória capaz de interferir negativamente com a cicatrização tecidual. Assim como em outros estudos, aqui se empregou a obstrução quase total do cólon, permitindo a passagem de gases, onde se observou em estudos prévios, estase venosa, edema e alteração da microvasculatura, além de redução da cicatrização de anastomoses colônicas ¹⁸. Em um modelo com obstrução do cólon com anel de silicone, seguida da ressecção e anastomose, observou-se alterações mais deletérias no intestino do que quando houve apenas a obstrução

intestinal. Algumas alterações histopatológicas identificadas foram perda do contorno epitelial, edema da submucosa com infiltrado inflamatório. Essas alterações persistiram durante muito tempo após a realização da anastomose, sugerindo comprometimento da cicatrização das anastomoses realizadas no cólon obstruído ²⁴.

A medida da pressão de ruptura de um tecido pode ser avaliada por dois métodos. Um deles seria a medida de resistência à exposição a uma força axial agindo no sentido longitudinal. Esse método seria ideal, por exemplo, para testar a ruptura em tendões e fâscias ²⁵. Esse método é objeto de crítica devido a dificuldade de aplicar igualmente a força em toda a circunferência colônica, pois a força não pode ser exercida de forma circular ²⁶. Outro método consiste na insuflação de ar ou água no lúmen intestinal, que é um dos métodos de avaliação da resistência da anastomose intestinal mais utilizado em pesquisas experimentais ^{26,27}. Considera-se esse como o método que mais se aproxima da situação clínica, simulando as forças de distensão que podem romper uma anastomose ²⁶. No presente estudo, usou-se o método de pressão de ruptura pela insuflação de ar, como utilizado em estudos prévios ^{22,20,28}.

O sildenafil é usado em seres humanos nas doses de 0,5 mg a 1,5mg/kg ¹⁸. Em estudos experimentais, alguns autores trabalharam com doses maiores de sildenafil devido a alta taxa metabólica dos ratos. Batukan (2007) ¹⁹ usou a dose de 3,75 a 15 mg/Kg, e Ayten (2008) ¹⁸ utilizou a dose de 8mg/Kg. Outros autores, como Uzun (2008) ¹³ e Dericy (2010) ¹⁵ usaram a dose de 10 mg/Kg, e Irkorucu (2009) ²⁹ usou dose maior, de 20 mg/Kg. Neste estudo, optou-se pelo emprego de doses mais baixas visando a redução do risco de eventos adversos. Dados de outro estudo ¹⁶ conduzido no Laboratório de Cirurgia Experimental sugeriram que doses mais altas de sildenafil associaram-se a aumento da mortalidade perioperatória. Portanto, para aumentar a segurança do procedimento optou-se por doses mais baixas da droga.

Alguns estudos avaliaram as anastomoses em modelos tratados com o sildenafil entre o 4º ao 8º dia pós-operatório. Irkorucu ²⁹ e Kaya ³⁰, ao avaliarem a reversão dos efeitos da hipóxia mediada pelo sildenafil e tadalafil respectivamente, escolheram o quarto dia. Já Ayten ¹⁸ e Uzun ¹³ escolheram, respectivamente, sétimo, e sétimo e terceiro dias. Diante desses dados, optou-se no presente estudo pela

avaliação da cicatrização no sétimo dia para a eutanásia e avaliação dos resultados. Sabe-se que na primeira fase da cicatrização da anastomose intestinal, que ocorre após a lesão, há redução transitória da força da cicatriz, indo de valores muito baixos nos três primeiros dias após sua construção até atingir as condições ótimas. Essa progressão parece se dever a mudanças fisiológicas no metabolismo da matriz. Durante os primeiros dias após a construção da anastomose, sua força e integridade são determinadas principalmente pela capacidade regenerativa da submucosa. Já na fase proliferativa, a neovascularização e os fibroblastos agem aumentando a resistência da anastomose por aumentar a produção de colágeno e mucopolissacarídes na ferida ^{7,23}. Assim, optou-se neste estudo pela avaliação da cicatrização da anastomose do cólon dos animais no 7º dia pós-operatório, quando a força da cicatriz estaria mais relacionada com a atividade de síntese do colágeno do que a presença da sutura na parede intestinal

Na determinação histológica da cicatrização, além da avaliação com uso da coloração com hematoxilina e eosina podem ser empregados outros métodos de coloração. A avaliação com uso de marcadores específicos aumenta a especificidade da pesquisa, como a coloração imunoistoquímica com o uso do anticorpo Ki67, usado para avaliação da proliferação celular ³¹, e a dosagem de hidroxiprolina, seja por grama de tecido ou por área de anastomose. Esta última, entretanto, tem apresentado uma diversidade de respostas que questiona sua real utilidade como método ^{26,27}. Para avaliação do colágeno podem ser utilizadas as colorações de tricromico de Gomori, alcian blue e van Gieson ³¹. Neste estudo, para avaliação histológica da cicatriz, optou-se pelas colorações com hematoxilina eosina para avaliação da inflamação e da angiogênese e do tricromico de Gomori para avaliação do colágeno.

A ruptura anastomótica, como a deiscência ou fístula, tem sido considerada uma das mais preocupantes intercorrências no pós-operatório das cirurgias do aparelho digestivo devido a sua incidência, morbidade e mortalidade ^{1,2}. Diversas estratégias foram descritas na abordagem das anastomoses intestinais de risco. Fatores capazes de estimular a neovascularização têm sido avaliados, baseado na premissa que a neovascularização, que geralmente tem início no segundo ou terceiro dia após a lesão, fornece um ambiente favorável à cicatrização ²³. Portanto, fatores

que possam atuar na manutenção de adequado aporte sanguíneo e de nutrientes garantindo a necessária demanda metabólica tecidual podem ser a chave para modular positivamente a cicatrização tecidual, principalmente em condições adversas, e o uso de agentes capazes de estimular a angiogênese tem sido avaliado em modelos experimentais e em estudos clínicos. Dentre esses agentes, o sildenafil tem sido pesquisado devido a sua ação vasodilatadora, que poderia favorecer a angiogênese, com possível melhora de outros parâmetros da cicatrização^{29,19,18,13}.

Os resultados do presente estudo mostraram que os animais dos grupos que receberam sildenafil IP e VO tiveram valores de pressão de ruptura maiores que o grupo não tratado. Esses resultados estão de acordo com a premissa que a vasodilatação local pode atuar como fator responsável por possível melhora do fluxo tecidual e dos parâmetros da cicatrização. Ayten (2008)¹⁸ e Irkorucu (2009)²⁹ encontraram melhora significativa dos níveis de pressão de ruptura do cólon com perfusão comprometida nos grupos de animais que receberam sildenafil quando comparados com os grupos controle. Irkorucu (2009)²⁹ demonstrou que o grupo que recebeu dose de 10mg/kg teve melhor resultado que o grupo que recebeu 20mg/kg, mas acredita que a dose de 20 mg poderia causar grande vasodilatação, hipotensão, excessiva ação antiinflamatória, e assim já não desempenharia papel positivo na cicatrização.

Os dados deste estudo mostraram que o sildenafil IP foi capaz de aumentar significativamente a angiogênese na região da anastomose colônica, o que pode estar associado com o ganho de força na cicatriz. É possível que exista efeito do fármaco na vasodilatação e estímulo à irrigação do tecido, o que aumentaria a eficiência do processo cicatricial, resultando em uma anastomose mais forte.

A cicatrização de uma anastomose colônica é, essencialmente, similar às fases da cicatrização de qualquer tecido do corpo. A inflamação aguda caracteriza o processo reparativo precoce. Na fase proliferativa da cicatrização, a neovascularização e a proliferação tecidual são os principais responsáveis pelo aumento da resistência da anastomose por aumentar a produção de colágeno e mucopolissacárides na ferida.^{7,26,1,23} Entretanto, há particularidades únicas na cicatrização de segmentos do tubo

digestivo. A função da submucosa não se restringe a fornecer a base de apoio para a mucosa. Sua função biológica se estende ao remodelamento tecidual. Rica em fibras colágenas imersas em matriz extracelular composta, entre outros, de proteoglicanos, essa camada tem papel importante na cicatrização das anastomoses. Dentre os proteoglicanos presentes na matriz, a fibronectina tem papel fundamental na interação célula-matriz, mantendo um contingente celular dentro do gel da matriz extracelular. Quando estimulados, os elementos celulares presentes na matriz são importantes nas etapas de proliferação, migração e adesão, controlando por meio de sinais bioquímicos, como quimioatrativos e fatores de crescimento, o processo cicatricial³².

A força de uma anastomose depende da presença das fibras colágenas, já tendo sido observado que a obstrução colônica alterou a síntese e conteúdo do colágeno na linha de sutura³¹. Neste estudo, verificamos que o uso do sildenafil, principalmente por via tópica, foi capaz de aumentar a presença de fibras colágenas, acentuadamente do colágeno jovem, na submucosa da região da anastomose colônica. É possível que a redução do colágeno nos modelos de obstrução do cólon esteja associada ao aumento da produção das metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz e, conseqüentemente, do colágeno.

As metaloproteinases (MP) são ativadas por interações entre células ou entre célula-matriz, mas podem também ser estimuladas por citocinas e fatores de crescimento. A ativação ocorre por fenômeno em cascata, por meio da ação de outras MP ou de proteinases teciduais e plasmáticas³³. Durante a cicatrização tecidual, a ativação das MP é necessária em várias etapas com o objetivo de criar espaços para a migração celular, a angiogênese e o remodelamento do colágeno^{34,35}. A ação dessas MPs são fisiologicamente interrompidas durante o processo cicatricial pelos inibidores das mieloperoxidases, sintetizadas principalmente por fibroblastos e células endoteliais^{33,36}. Observou-se que, no cólon com semi-obstrução e obstrução total, houve maior concentração das metaloproteinases, sugerindo que a hipóxia tecidual associou-se com aumento da participação desta na cicatrização tecidual, tornando a anastomose mais frágil^{7,37,31}. Também observou-se que, ao contrário da cicatrização de uma anastomose em cólon normal, na vigência de obstrução as MP encontram-se

localizadas não somente nas proximidades da anastomose, mas também em regiões mais distantes do cólon. Observou-se também que no cólon obstruído a atividade da MP estava significativamente mais pronunciada que no cólon normal ^{37,38}.

Um dos mecanismos associados com a maior produção de MP é a presença de polimorfonucleares neutrófilos na região. Observou-se redução da concentração de colágeno na região da anastomose ^{39,40,41}, que coincide com a presença de polimorfonucleares (PMN) na região da anastomose. Desde o reconhecimento da existência de uma colagenase derivada de neutrófilos, concluiu-se que a degradação do colágeno seria neutrófilo dependente ⁴². Essa colagenase é conhecida hoje como metaloproteinase 8 (MP8), e é estocada em grânulos dentro dos PMN, e secretada sob estimulação ^{43,44}. Diante da obstrução intestinal, dois mecanismos deletérios podem ser identificados, a presença de fezes em estase, com consequente proliferação bacteriana, e a dilatação do cólon ³⁹, promovendo a baixa perfusão da parede colônica. Assim, haveria a abertura de óstios na mucosa, favorecendo a passagem de bactérias da luz intestinal para a submucosa ⁵, com estímulo para a inflamação nessa região e aumento na concentração de MP, com aumento da colagenólise e enfraquecimento da cicatriz. Entretanto, não observamos, neste estudo, diferença na população de PMN quando comparadas as contagens encontradas nos grupos com obstrução colônica e tratados ou não com o sildenafil, sugerindo que o sildenafil pode não ser eficiente na reversão desse mecanismo de enfraquecimento da anastomose em modelos de obstrução colônica.

Os dados deste estudo sugerem que a vasodilatação induzida pelo sildenafil foi capaz de melhorar a cicatrização do cólon obstruído de ratos, indicando que esse fármaco pode ter ação moduladora na cicatrização tanto em seu uso tópico quanto administrada oralmente. O mecanismo pelo qual o fármaco promoveu a melhor cicatrização pode estar relacionado com a vasodilatação tecidual, por ação sobre o metabolismo do óxido nítrico, com aumento na angiogênese e na síntese do colágeno. Portanto, esses resultados permitem inferir que em anastomoses de risco, como aquela realizada na obstrução do cólon, o uso do sildenafil seria capaz de melhorar a cicatrização por provável estímulo à angiogênese e à fibroplasia, por talvez

aumentar a irrigação sanguínea no segmento afetado e revertendo as condições desfavoráveis à cicatrização no cólon obstruído de ratos.

9. CONCLUSÃO

O uso do sildenafil, tanto em sua aplicação intraperitoneal quanto administrada por via oral, foi capaz de melhorar a pressão de ruptura de anastomoses do cólon de ratos com semi-obstrução intestinal, mas a aplicação tópica mostrou-se superior quando avaliada também os parâmetros histológicos de cicatrização, sugerindo ser essa via a de maior eficiência na restauração dos parâmetros fisiológicos de cicatrização no cólon obstruído de ratos.

10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 Ruggiero R, Sparavigna L, Docimo G, Gubitosi A, Agresti M, Procaccini E, Docimo L Post-operative peritonitis due to anastomotic dehiscence after colonic resection. Multicentric experience, retrospective analysis of risk factors and review of the literature. *Ann Ital Chir* (2011). 82:369-75.
- 2 Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study *Int J Colorectal Dis.* (2008). 23:265-70.
- 3 Irkorucu O, Comert M. Effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: Its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg* (2009) 33: 160.
- 4 Leme MBP, Matos D, Luderer LA, Fonseca DA Avaliação do efeito da colostomia proximal na cicatrização de anastomoses colocólicas em ratos com obstrução intestinal. *Rev Col Bras Cir* 2001. 28:109-115
- 5 -Awady SI, El-Nagar M, El-Dakar M, Ragab M, Elnady G Bacterial translocation in an experimental intestinal obstruction model: C-reactive protein reliability? *Acta Cir Bras* 2009. 24:98-106
- 6 Bezuti MT, Féres O, Campos AD, Aprilli F, Rocha JJR, Garcia RS, Joviliano OFD Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 2002. 17 (supl 3):109-115
- 7 Törnqvist A, Blomquist P, Jiborn H, Zederfeldt B Anastomotic healing after resection of left-colon stenosis: effect on collagen metabolism and anastomotic strength. An experimental study in the rat. *Dis Colon Rectum.* 1990. 33:217-21.

- 8 Uludag M, Citgez B, Ozkaya O, Yetkin G, Ozcan O, Polat N, Isgor A Effect of the amniotic membrane on healing of colonic anastomosis in experimental left-sided colonic obstruction. *Langenbecks Arch Surg* 2010. 395:535-43
- 9 da Costa MA, Campos AC, Coelho JC, de Barros AM, Matsumoto HM. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. *J Parent Ent Nutr* (2003) 27: 182 – 6.
- 10 Duraker N, Bender O, Memisoglu K, Yalciner A Intraoperative bowel irrigation improves anastomotic collagen metabolism in the left-sided colonic obstruction but not covering colostomy. *Int J Colorectal dis* 1998. 13:232-4.
- 11 Çetinkaya Z, Esen K, Ozercan I H, Ustundag B, Ayten R, Aygen E. The effect of bosentan on healing of colonic anastomosis. *W J Emerg Surg* (2006) 1: 37
- 12 Calmak G, Bahadir B, Acikgoz S, Pasaoglu H, Ankarali H, Ugurbas E, Demirtas C, Comert M. the effects of resveratrol on the healing of left colonic anastomosis. *Journal of Investigative Surgery* (2009) 22: 353-361
- 13 Uzun H, Konukoglu D, Nuri M K, Ersoy E Y, Ozçevik S. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: Its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg* (2008) 32:2107-2113
- 14 Gur S, Kadowitz PJ, Serefoglu EC, Hellstrom WJ PDE5 inhibitor treatment options for urologic and non- urologic indications: 2012 update. *Curr Pharm Des.* (2012) Jun 29. [Epub ahead of print]
- 15 Derici H, Kamer E, Unalp H R, Diniz G, Bozdog A, Tansug T, Ortac R, Erbil Y. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbecks Arch Surg* (2010) 395: 713-718
- 16 Barral SM, Araujo ID, Vidigal PV, Mayrink CA, Araujo AD, Costa PR Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cir Bras* 2011. 26:314-9
- 17 Salcido RS. Viagra and wound healing: the NO connection. *Adv Skin Wound Care* (2008) 21: 106-109

- 18 Ayten R, Çetinkaya Z, Girgin M, Ozercan I, Ustundag B, Aygen E. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomosis and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. *Disease of the colon e rectum* (2008) 51: 1837-1841
- 19 Batukan C, Ozgun M T, Basbug M, Muderris II. Sildenafil reduces postoperative adhesion formation in rat uterine horn model. *European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology* (2007) 135 183-187
- 20 Bicalho PRR, Mayrink CAC, Fernandes F, Alvarenga DG, Araujo ID, Nunes TA, Reis FA Treatment with chlorhexidine modifies the healing of the colon anastomosis in rats. *J Invest Surg* 2011. 24: 8-12
- 21 Souza C. Uso de adesivos biológicos em anastomoses intestinais [Tese de Doutorado, Minas Gerais]. Belo Horizonte; 1993.
- 22 Milagres LC, Duval-Araujo I, Barral SM, Grossi GCX Efficacy of the povidine-iodine irrigation in healing of colonic anastomosis in rats. *Arq Gastroenterol*, 2005. 42: 95-98
- 23 Thompson SK, Chang EY, Jobe BA Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery*. (2006). 26:131-6.
- 24 Törnqvist A, Blomquist P, Ahonen J, Jiborn H, Zederfeldt B. The effect of stenosis on collagen metabolism in the colonic wall. Studies in the rat. *Acta Chir Scand*. 1988 May-Jun;154(5-6):389-93
- 25 Naresse L E, Mendes E F, Curi P R, Lucchiari PH, Kobayasi S. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* (1987) 42: 204-8
- 26 Koruda M J, Rolandelli R H. Experimental studies on the healing of colonic anastomosis. *J Surg Res* (1990) 48: 504-15.
- 27 Rollandelli R H, Buckmire M A, Bernstein K A. Intravenous butyrate and healing of colonic anastomosis in the rat. *Dis Colon Rectum* (1997) 40: 67-70.

- 28 Arantes VN, Okawa RY, da Silva AA, Barbosa AJ, Petroianu A. Efeito da metilprednisolona sobre a tensão anastomótica jejunal. *Arq Gastroenterol* 1994. 31: 97-102.
- 29 Irkorucu O, Ucan B H, Camak G K, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, Bahadir B, Karakaya K Demirtas C, Ankarali H, Kertis G, Pasaoglu H Comert M. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis; Yes, "no". *Int J Surg* (2009) 7 (1) 39-43
- 30 Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. *Surg Today* (2010) 40: 555-560
- 31 Rehn M, Agren MS, Sik I Collagen levels are normalized after decompression of experimentally obstructed colon. *Colorectal Dis* (2011). 13:e165-e169
- 32 Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):423-8.
- 33 Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1334-47
- 34 Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221-33
- 35 Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):373-98
- 36 Epstein EH, Jr., Munderloh NH. Isolation and characterization of CNBr peptides of human (alpha 1 (III))3 collagen and tissue distribution of (alpha 1 (I))2 alpha 2 and (alpha 1 (III))3 collagens. *J Biol Chem.* 1975 Dec 25;250(24):9304-12
- 37 Savage FJ, Lacombe DLP, Hembry RM, Boulos PB Effect of colonic obstruction on the distribution of matrix metalloproteinases during anastomotic healing. *Br J Surg* (1998). 85:72-5

- 38 Syk I, Mirastschijski U, Jeppsson BW, Agren MS. Experimental Colonic Obstruction Increases Collagen Degradation by Matrix Metalloproteinases in the Bowel Wall. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2003;46(9):1251-9
- 39 Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. *Am J Surg*. 1978a. 135:333-40
- 40 Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. II. Breaking strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg*. 1978 Nov;136(5):595-9.
- 41 Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg*. 1978 Nov;136(5):587-94. (c)
- 42 Horwitz AL, Hance AJ, Crystal RG. Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Mar;74(3):897-901.
- 43 Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med*. 2000 Oct;6(4):391-407
- 44 Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, et al. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1990 Jul 15;265(20):11421-4

Anexos

ANEXO 1 – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Healing of anastomosis in semi-obstructed colon of rats after treatment with intraperitoneal or systemic sildenafil

Authors: João L O G Andrade, Cláudio A C Mayrink, Poliana A Faraj, Emerson R Lopes, Paulo R R Bicalho, Daniel G Alvarenga, Ivana Duval-Araujo

Institution: Laboratory of Experimental Surgery, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais.

Correspondence to: João Luis O G Andrade.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Anastomosis held in treatment obstructed colon presents higher incidence of fistula, with increased post-operative morbidity and mortality. It is believed that this occurs due to changes in the wall of the bowel segment as edema or changes of microcirculation, and has been studied treatments which may reduce the deleterious effects of intestinal obstruction in healing of anastomosis. **OBJECTIVE:** To evaluate the healing of left colon in rats in presence of bowel obstruction after use of oral or topic sildenafil. **METHODOLOGY:** There were studied 17 females Wistar rats distributed into three groups: untreated (n = 6), colonic obstruction, colonic resection, primary anastomosis; Sildenafil topic (n = 5), colonic obstruction, colonic resection, primary anastomosis and peritoneal irrigation with sildenafil at the end of surgery; Oral Sildenafil (n = 6), colonic obstruction, colonic resection and primary anastomosis, administration of oral sildenafil by gastric gavage at the end of surgery. The colonic obstruction was done through colonic ligation with 2-0 silk against a catheter with the goal of creating an abrupt narrowing of colonic lumen, allowing passage of gas. After 24 hours, there was made resection of the silk-ligated area and held the colonic anastomosis. The animals were killed on the seventh day after the anastomosis and evaluated for the presence of the fistula, bursting pressure and angiogenesis at microscopy. **RESULTS:** The groups that have received sildenafil IP and VO presented increase in bursting pressure when compared with untreated group. There was also increased angiogenesis in animals treated with sildenafil IP when compared to animals not treated and the group treated with sildenafil VO. **CONCLUSION:** The use of sildenafil was able to stimulate the healing of obstructed colon in rats

KEYWORDS: Anastomotic healing; colonic obstruction; sildenafil

INTRODUCTION

Obstruction of the colon is a relatively common cause of abdominal emergency surgeries, and the obstruction of left colon is a real surgical problem. Their treatment is a matter of controversy in relation to the primary anastomosis, or colostomy and secondary performing anastomosis, but has been proposed recently the resection and primary anastomosis in cases of intestinal obstruction. The high incidence of complications due to suture dehiscence and anastomotic leaks in obstructed colon, when anastomosis is performed primarily, makes the colostomy a safe alternative in cases of colonic occlusion.^{1,2}

The healing of anastomosis can be negatively influenced by several local and systemic factors. Previous studies have shown that factors such as malnutrition, protein and vitamin deficiency, severe anemia, ischemia, diabetes, among others, can be affect the healing of intestinal anastomosis. There was demonstrated that intestinal obstruction can act adversely in healing. The presence of colonic obstruction can cause hypoxia secondary to distention of the colon segment, favoring also the passage of bacteria from the lumen to the intestinal wall^{3,4}.

In anastomosis performed in the presence of bowel obstruction, there have been evaluated several adjuvant factors of healing as erythropoietin, short chain fatty acids, glutamine, saline solution, povidone-iodine, fibrin glue and peritoneal graft. With the goal of trying to increase the inflow of blood has been reported the use of Bosentan⁵, Resveratrol⁶ and, mainly, factors that interfere with the production of nitric oxide (NO), as the 5-phosphodiesterase five (PDE - 5)^{1,7,8}. The sildenafil, a potent and specific inhibitor of PDE-5, was tested for various purposes such as pulmonary hypertension, chronic neuralgia, neurogenesis, Alzheimer 's disease, spinal trauma, cutaneous flaps, intestinal anastomosis and prevention of adhesions. It has been postulated that its beneficial action in these situations is due to neoangiogenesis stimulation.^{7,8,9,10,1,11}

It is then possible that the use of sildenafil can act as a positive modulator on healing of colonic obstructed segments by perhaps act as stimulator of neoangiogenesis. So, the purpose of this study was to evaluate the possible beneficial effect of sildenafil in healing of obstructed colon in rats.

MATERIAL AND METHODS

This study was submitted to the Committee of Ethics in Animal experimentation of Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFGM) and approved with Protocol 060/09. 17 female Wistar rats (3-4 months old and average weight of 300 g) were randomly distributed in three experimental groups:

- Untreated (n=6): partial colonic obstruction, primary resection and anastomosis;
- Topic sildenafil (n=5): partial colonic obstruction, primary resection and anastomosis. Use of sildenafil by peritoneal irrigation (1 mg/Kg) at the end of surgery;
- Oral sildenafil oral (n=6): partial colonic obstruction, primary resection and anastomosis. Use of sildenafil by oral gavage (1 mg/Kg) at the end of surgery.

The animals were anesthetized with ketamine, 60 mg/Kg (Cristália Prod. Farmac Ltda., São Paulo, Brasil) and xylazine, 10 mg/Kg (Schering-Plough, São Paulo, Brasil) applied by intraperitoneal injection, (IP). Once anesthetized, there were administered to all animals 30 mg/Kg of Ceftriaxone (Roche, São Paulo, Brasil), intramuscularly (IM). After obtained anesthetic level, the animals were submitted to midline laparotomy and held the colonic obstruction (Figure 1) by means 2-0 silk ligation of transverse colon 2 cm above splenic flexure against nº 12 nelaton catheter. After ligation, the catheter was removed getting in the local silk bandage with partial obstruction of colon. After that, the abdomen was closed, analgesic administered (buprenorphine 0.03 mg/Kg subcutaneously twice a day during 24 hours) animal placed at rest in individual cage, with free access to food and water.

After 24 hours of the induction of pseudo-obstruction, the animals were anesthetized again, abdomen opened and obstructed segment resected 3 mm above and below of silk bandage. Colonic anastomosis was performed with separate vycril 5-0 suture. Then, the peritoneal cavity was washed with 15 ml of 0.9% saline solution maintained at a temperature of 38° C and the abdomen closed in two planes, continuous suture of 3-0 polyglactin in the muscle-aponeurotic plane and mononylon 4-0 separate suture in skin plane. The animals received 25% glucose oral solution during 12 hours after surgery and after that free access to water and food.

There was used in the experiment sildenafil solution at a concentration of 0.1 mg/ml. On oral administration group, at the end of the surgery and after anesthesia recovery, there was made gastric gavage with nº 6 nelaton, and administered a single-dose of sildenafil at a concentration of 1 mg/kg. In the topical group, after the construction of the anastomosis there was put into peritoneal cavity a solution of sildenafil (1 mg/kg) after closure of the abdominal wall.

The animals were evaluated on the seventh day after surgery. After anesthesia, there was made new laparotomy and macroscopic parameters of stenosis of anastomosis and anastomotic leakage evaluated. The stenosis of anastomosis was classified as grade I (slight dilation, one twice the normal caliber), grade II (moderate dilation, between one and two twice the normal caliber) or grade III (considerable dilation, more than two twice the normal caliber), as previously described¹³ and then grouped into absent (grades I) or present (grades II and III). The signs of anastomotic leakage as abscess or peritonitis were considered as present or absent. After that, the animals were killed by exsanguinations and colon segments containing in central point the anastomosis were removed for functional studies (study of burst pressure) and microscopic evaluation of healing parameters.

Bursting pressure: After opening of the peritoneal cavity, a 8 cm segment of the colon having the anastomosis in its central point was removed with their adhesions to study of burst pressure as standardized technique^{12,13}. Briefly, after clamping one end of colonic segment, the burst pressure was evaluated by air insufflation in another end of the colon, under continuous flow, with the colonic segment put into a flask containing 0.9% saline solution. The catheter through which the air was inflated is connected to an aneroid manometer by a three way connection, providing the pressure exerted on the anastomosis. The measurement of burst pressure was given by the recorded value at the moment of the rupture of the anastomosis, determined by the presence of bubbling of liquid contained in the flask.

Histological analysis: The colon segment containing the anastomosis was placed into 10% formalin, included in paraffin and made 4 μ m histological stained with hematoxylin/eosin and gomori's trichrome. These slides were double-blinded examined by only one pathologist (DGA) in an optical microscope (Nikon-Alphaphot-2-Tokyo-Japan and made evaluation of inflammation, angiogenesis and fibroplasia.

Inflammation: The colonic submucosa was evaluated qualitatively and quantitatively. In qualitative analysis, the inflammation was described as 1+ (absente), 2+ (discrete), 3+ (moderate) or 4+ (intense). To statistical analysis, the histological features 1+ and 2+ were characterized as absent, and 3+ and 4+ as present. It was also made histomorphometry in the submucosa, with polymorphonuclear leukocytes counting in 20 random fields.

Angiogenesis: There was made evaluation of the degree of angiogenesis, as absent (1+), discrete (2+), moderate (3+) and severe (4+). For comparison between groups, these alterations were categorized in absent (1+/2+) or present (3+/4+).

Fibroplasia: To assess the fibroplasia there was made qualitative and quantitative evaluation of collagen fibers in slides stained by Gomori's trichrome. The immature and mature fibers were classified in absent, discrete (up to 10 fibers per field), moderate (10 to 20 fibers per field) and severe (more than 20 fibers per field). Also there was counted the number of immature and mature fibers in 20 random fields, and calculated the average number of each fiber type in colonic submucosa.

The statistical analysis was made using Statistical packages Assisat 7.6 beta[®] and Epi-info[®]. Qualitative data were compared between groups through the Chi-square test with Fisher correction. Quantitative data were compared between groups through Mann Whitney test. There were considered in both tests differences at the level of 5%.

RESULTS

The macroscopic analysis of the region showed no anastomosis fistula identifiable to any animal, either tamponated or for free cavity. The stricture of anastomosis classified as II or III were observed in 4 (66.7%) animals of no treated group, and only one in both sildenafil VO (20%, $p=0.06$) or sildenafil IP (16.7%, $p=0.04$). There was a significant reduction in stenosis in animals treated with IP or VO sildenafil.

The burst pressure was increased after treatment with IP sildenafil. The mean of bursting pressure was 155.0 ± 30.2 in untreated group, 250.0 ± 64.0 in the group treated with IP sildenafil and 216.7 ± 15.1 in animals treated with sildenafil VO. There was significant difference when compared untreated animals and those treated with sildenafil IP ($p=0.002$) or sildenafil VO ($p=0.001$, Figure 2)

The histological analysis showed that the inflammation classified as moderate was seen in 2 animals in obstructed group (33,3%), 2 animals treated with IP sildenafil (40%) and 4 of the animals treated with oral sildenafil (66,7%). The average of polymorphonuclear leukocytes by field in the submucosa of the animals with pseudo-obstruction was 40.6 ± 6.5 , in animals treated with sildenafil IP was 41.7 ± 16.8 cells and in group treated with sildenafil VO was 51.9 ± 12.5 cells per field. There was no significant difference in the intensity of inflammation among the three groups

At histology, grade 3+ and 4+ angiogenesis was seen in 3 (60%) of animals treated with IP sildenafil, and none of these no treated or treated with oral sildenafil, with increase of angiogenesis in animals treated with IP sildenafil ($p=0.03$).

In relation to fibroplasia, qualitative assessment showed that moderate/severe fibroplasia occurred in an animal of the group with pseudo-obstruction (16.7%), 4 those of group with pseudo-obstruction treated with sildenafil IP (80%) and 2 animals with pseudo-obstruction treated with sildenafil orally (33.3%). There was showed a significant increase in fibroplasia in the group treated with sildenafil IP when compared to the group with obstruction ($p=0.04$).

The presence of collagen fibers classified as intense (more than 20 fibers per field) occurred in 5 animals in the Group OBS (83.3%), all 5 animals of the SIP Group (100%), as well as all animals in SVO group (6 animals, 100%). Qualitatively, the presence of young collagen fibers classified as intense was seen in two animals of OBS group, three animals in SIP group and three animals in SVO group. The amount of mature collagen fibers was classified as discrete in five of the six Group OBS, all five animals of the SIP group and four of six animals in SVO group, without significant difference between the groups.

The average number of collagen fibers (immature or mature) by field was 25.33 ± 2.35 fibers in group of animals with colonic obstruction without treatment, 30.6 ± 1.6 fibres in the group treated with IP sildenafil and 27.67 ± 1.94 in animals treated with VO sildenafil. There was increase in number of collagen fibers in the Group of animals treated with sildenafil IP when compared to those not treated ($p=0.04$), but not when compared to animals treated with sildenafil VO and animals of the OBS group (figure 3).

The number of thin, immature collagen fibers in the submucosa of animals with colonic obstruction and not treated was 16.83 ± 1.90 . In animals treated with sildenafil IP the number of immature collagen fibers was 22.20 ± 1.83 and those treated with sildenafil VO was 18.17 ± 1.22 . When compared with animals with pseudo-obstruction and not treated, there was a significant increase in the number of these fibers in animals treated with sildenafil IP ($p=0.03$), but not when compared to untreated animals and those treated with sildenafil VO.

The average of mature collagen fibers in the colonic submucosa of OBS group was 8.5 ± 1.06 fibers per field. In the SIP group the average was 8.4 ± 1.12 fibers and in SVO was 9.5 ± 1.36 fibers per field. There was no significant difference when comparing the two treatments (sildenafil IP or VO) with the animal group.

DISCUSSION

The intestinal anastomosis are among the most performed surgical procedures in general surgery, and the failure of healing is cause of fistulas, that occur between 0.5% to 30% of the operations carried out, joining the increased morbidity and mortality. Among its various etiologies are included hypoxia, infection, and other local and systemic factors^{5,11}.

Several conditions are associated with the unfavorable evolution of the anastomosis performed in obstructed colon as distention, edema, low oxygen tension and alkaline intraluminal pH. Among these mechanisms, tissue hypoxia is observed in some experimental models³, and occurs through accumulation of gas and liquid in the obstructed intestinal lumen, increase in intramural pressures and intestinal wall

reduction of perfusion. When the intraluminal pressure increases and equals to blood pressure, intestinal hypoxia occurs that favors increased permeability of the intestinal wall due to the emergence of micropores on its wall, through which pass water and ions. The progression of the colonic distension leads to gradual increase of hypoxia, which culminates with wall necrosis and passage of the luminal content to the peritoneum.¹⁴

In this study there was evaluate the stimulation of healing in intestinal semi-occlusion model, considering also that as a risk anastomosis. The abrupt reduction of colonic lumen with proximal dilation, venous stasis and intestinal wall edema, is able to reduce oxygenation in microcirculation, while still allowing the passage of bacteria from the intestinal lumen to the submucosa, with marked inflammatory reaction able to interfere negatively with the tissue healing.

Some studies have evaluated the anastomosis in models treated with sildenafil between 4th to 8th postoperative day.^{y1,y15} Irkorucu and Kaya in assessing the reversion of the effects of hypoxia by sildenafil and tadalafil respectively, chose the best effect on fourth day^{y9} and Uzun and Ayten already chose¹¹ respectively, seventh, and seventh and third days. On these data, we opted for the evaluation of healing on the seventh day. It is known that in the first phase of the healing of intestinal anastomosis that occurs after injury, there is transitional reduction of strength of scar, going from very low values in the first 3 days after its construction until it reaches the optimum conditions. This progression seems to be due to physiological changes in the matrix metabolism. During the first days after the construction of the anastomosis, its strength and integrity are determined mainly by the regenerative capacity of the submucosa. Already in the proliferative phase, neovascularization and fibroblasts act increasing the resistance of the anastomosis by increasing the production of collagen and mucopolysaccharides in the wound.

The measurement of burst pressure of a tissue can be evaluated by various methods. One would be the measure of resistance to a force acting in longitudinal axial direction. This method would be ideal, for example, to test the break in tendons and fascia¹⁶. Another method consists in inflation of air or water in the intestinal lumen, which is one of the methods of assessment of resistance of intestinal anastomosis used in experimental research^{17,18,19,20}. In this study, there was used the method of anastomotic burst pressure by air insufflations already used to assess the resistance in an prior works^{12,13}.

Anastomotic disruption, such as dehiscence or fistula, has been considered one of the most worrisome post-operative complications of digestive tract surgeries due to its incidence, morbidity and mortality¹. Several strategies have been described in the approach of intestinal anastomosis. Factors able to stimulate neovascularization have been evaluated, based upon the premise that neovascularization, which usually starts in the second or third day after the injury, provides the best environment to healing. Therefore, factors that may act on the maintenance of adequate blood supply and nutrients ensuring the necessary tissue metabolic demand may be the key to positive modulation of tissue healing, especially in adverse conditions⁸. The use of agents capable of stimulating angiogenesis has been evaluated in experimental models and in clinical studies. Among these agents, sildenafil has been researched due to its vasodilating action, which could promote angiogenesis. Literature data seem to support this theory, as Ayten and Irkorucu studies^{1,9} who have found significant

improvement of burst pressure levels in the groups that received sildenafil when compared with control groups.

The results of this study showed that the animals in groups that have received sildenafil IP and VO had increase in burst pressure when compared with the untreated group. These results agree with the premise that the local vasodilation can act as a factor responsible for possible improvement of the tissue and the parameters of flow healing^{7,9,11,18}. Also verify that the IP sildenafil was able to significantly increase angiogenesis when compared to other groups, which also demonstrates a likely effect of this drug in vasodilation and stimulating the tissue irrigation, which would increase the efficiency of the healing process, resulting in a stronger anastomosis.

The strength of an anastomosis depends on the presence of collagen fibers, having already been observed that the colonic pseudo-obstruction altered synthesis and collagen content in the suture line^{21,22}. In this study, we find that the use of sildenafil, mostly topically, was able to increase the presence of collagen fibers, mainly young collagen, in the submucosa of colonic anastomosis. It is possible that the reduction of collagen in the models of colon obstruction is associated with increased production of metalloproteinases, responsible for the degradation of the matrix and, consequently, of collagen. It was observed that, in the colon with obstruction, there was a higher concentration of metalloproteinases, suggesting that the tissue hypoxia associated with increased participation of this in tissue healing, making the weakest anastomosis^{23,24}. One of the mechanisms associated with the largest production of metalloproteinases is the presence of polymorphonuclear neutrophils in the region. The low perfusion of colonic wall allows the opening of ostia in mucosa³, with stimulus for inflammation in the region and increase in concentration of metalloproteinases with increased collagenolysis and weakening of the anastomosis. However, it was not observed in our study, statistical differences in population of PMN compared the scores found in groups with pseudo-obstruction and treated or not with sildenafil.

The data from this study suggests that the vasodilation induced by sildenafil was able to improve the healing of semi-obstructed colon of rats, indicating that this drug may have modulating action in healing both in its topical use as administered orally. The mechanism by which the drug has promoted better healing can be related to tissue vasodilation, for action on the metabolism of nitric oxide, with increase in angiogenesis and collagen synthesis. Therefore, these results allow us to infer that at risk like that anastomosis performed in obstruction of the colon, the use of sildenafil would be able to improve healing by likely to stimulate angiogenesis, fibroplasia and maybe increase the blood supply in the affected segment and reversing the conditions unfavourable to healing in the semi-obstructed colon of mice.

REFERENCES

- 1 Irkorucu O, Ucan B H, Camak G K, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, Bahadir B, Karakaya K Demirtas C, Ankarali H, Kertis G, Pasaoglu H Comert M. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis; Yes, "no". *Int J Surg* 2009. 7: 39-43.

- 2 Aguilar-Nascimento JE, Caporossi C, Nascimento M Comparação entre ressecção com anastomose primária e ressecção em estágio nos tumores obstrutivos do cólon esquerdo. *Arq Gastroenterol* 2002. 39:240-5.
- 3 -Awady SI, El-Nagar M, El-Dakar M, Ragab M, Elnady G Bacterial translocation in an experimental intestinal obstruction model: C-reactive protein reliability? *Acta Cir Bras* 2009. 24:98-106.
- 4 Bezuti MT, Féres O, Campos AD, Aprilli F, Rocha JJR, Garcia RS, Joviliano OFD Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 2002. 17 (supl 3):109-15.
- 5 Çetinkaya Z, Esen K, Ozercan I H, Ustundag B, Ayten R, Aygen E. The effect of bosentan on healing of colonic anastomosis. *W J Emerg Surg* 2006. 1: 37.
- 6 Calmak G, Bahadir B, Acikgoz S, Pasaoglu H, Ankarali H, Ugurbas E, Demirtas C, Comert M. The effects of resveratrol on the healing of left colonic anastomosis. *Journal of Investigative Surgery* 2009. 22: 353-61
- 7 Batukan C, Ozgun M T, Basbug M, Muderris II. Sildenafil reduces postoperative adhesion formation in rat uterine horn model. *European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology* 2007. 135 183-7
- 8 Derici H, Kamer E, Unalp H R, Diniz G, Bozdog A, Tansug T, Ortac R, Erbil Y. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbecks Arch Surg* 2010. 395: 713-8
- 9 Ayten R, Çetinkaya Z, Girgin M, Ozercan I, Ustundag B, Aygen E. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. *Disease of the colon e rectum* 2008. 51: 1837-41
- 10 Salcido RS. Viagra and wound healing: the NO connection. *Adv Skin Wound Care* (2008) 21:106-9
- 11 Uzun H, Konukoglu D, Nuri M K, Ersoy E Y, Ozçevik S. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: Its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg* 2008. 32:2107-13
- 12 Milagres LC, Duval-Araujo I, Barral SM, Grossi GCX Efficacy of the povidine-iodine irrigation in healing of colonic anastomosis in rats. *Arq Gastroenterol*, 2005. 42: 95-8
- 13 Bicalho PRR, Mayrink CAC, Fernandes F, Alvarenga DG, Araujo ID, Nunes TA, Reis FA Treatment with chlorhexidine modifies the healing of the colon anastomosis in rats. *J Invest Surg* 2011. 24: 8-12
- 14 Leme MBP, Matos D, Luderer LA, Fonseca DA Avaliação do efeito da colostomia proximal na cicatrização de anastomoses colocólicas em ratos com obstrução intestinal. *Rev Col Bras Cir* (2001). 28:109-115
- 15 Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. *Surg Today* 2010. 40: 555-60
- 16 Naresse L E, Mendes E F, Curi P R, Lucchiari PH, Kobayasi S. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1987. 42:204-8
- 17 Koruda M J, Rolandelli R H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 1990. 48: 504-15.
- 18 Rollandelli R H, Buckmire M A, Bernstein K A. Intravenous butyrate and healing of colonic anastomoses in the rat. *Dis Colon Rectum* 1997. 40:67-70

- 19 Genzini T, Carneiro D'Albuquerque L A, Miranda M P, Scafuri AG, de Oliveira e Silva A. Intestinal Anastomoses. Rev Paul Med 1992. 110: 183-92
- 20 Petroianu A, Souza SD, Martins SG, Alberti LR, Vasconcellos. Effect of sodium carboxymethylcellulose and methylprednisolone on the healing of jejunal anastomoses in rats. Braz J Med Biol Res 2001. 34:519-23
- 21 Duraker N, Bender O, Memisoglu K, Yalciner A Intraoperative bowel irrigation improves anastomotic collagen metabolism in the left sided colonic obstruction but not covering colostomy. Int J Colorectal Dis 1998. 13:232-4
- 22 Rehn M, Agren MS, Sik I Collagen levels are normalized after decompression of experimentally obstructed colon. Colorectal Dis 2011.. 13:e165-e169
- 23 Törnqvist A, Blomquist P, Jiborn H, Zederfeldt B Anastomotic healing after resection of left-colon stenosis: effect on collagen metabolism and anastomotic strength. An experimental study in the rat. Dis Colon Rectum 1990. 33:217-21.
- 24 Savage FJ, Lacombe DLP, Hembry RM, Boulos PB Effect of colonic obstruction on the distribution of matrix metalloproteinases during anastomotic healing. Br J Surg 1998. 85:72-5

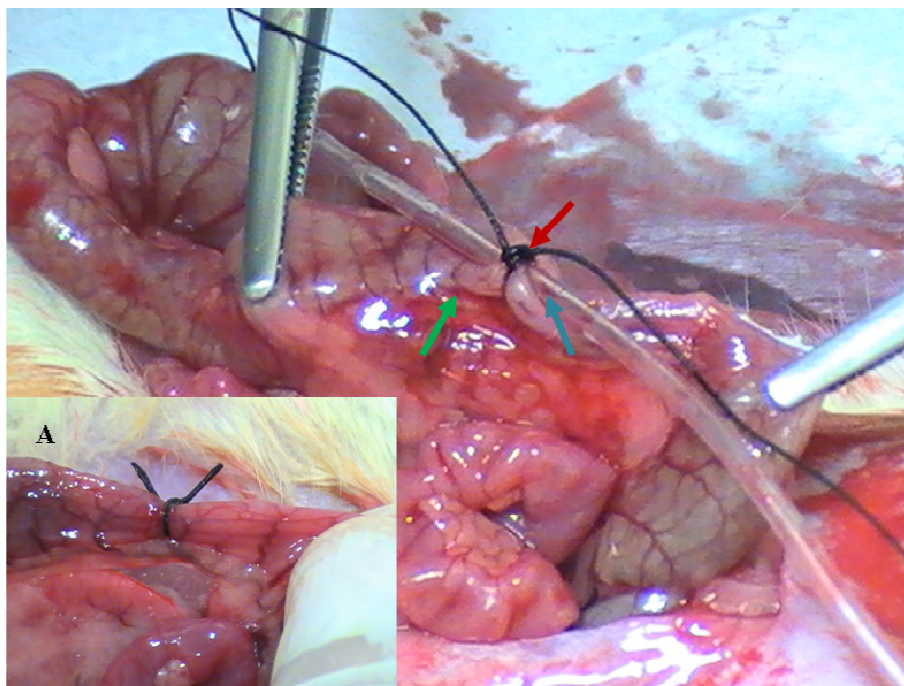
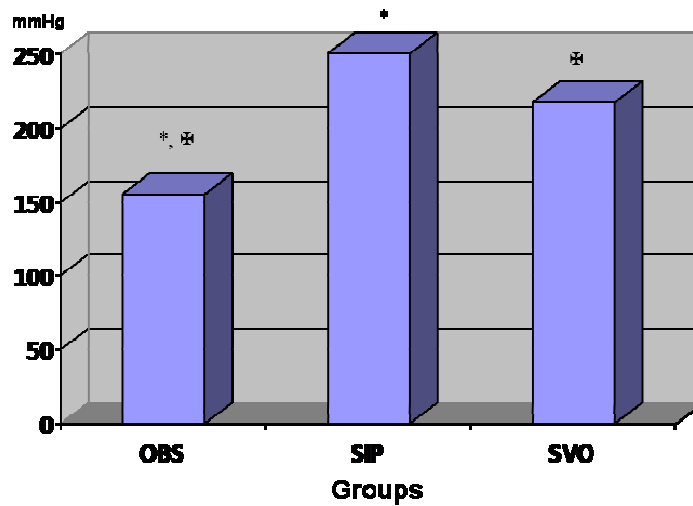


Fig. 1 Method of colonic obstruction by means colon ligation: transverse colon (green arrow) ligated with 2-0 silk (red arrow) against nelaton catheter (blue arrow). In detail (A), the final appearance of the procedure after removal of nelaton catheter.



* p=0,002, ⊗ p=0,001

Figure 2 - Median Burst pressure value of colon anastomoses of wistar rats after colon obstruction (OBS) and untreated or treated with sildenafil IP (SIP) or sildenafil VO (SVO)

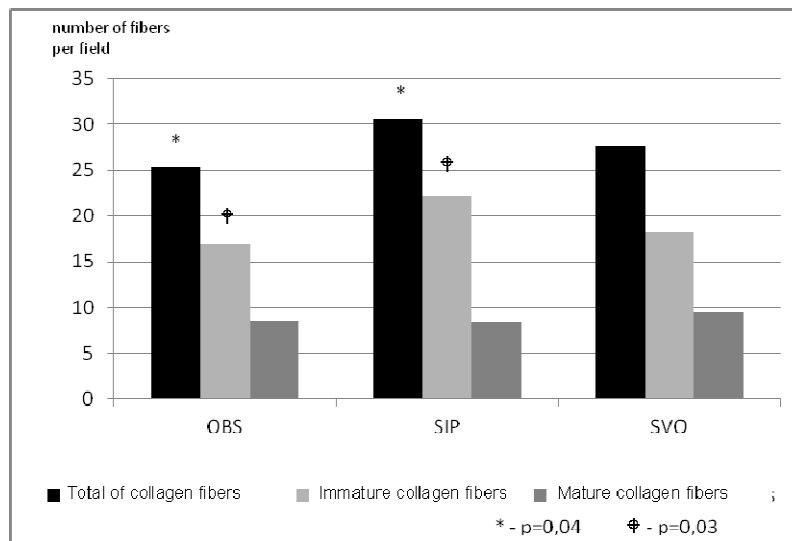


Figure 3-Median of collagen fibers count in the submucosa of the region of colon anastomosis of wistar rats with colon obstruction (OBS) and treated with sildenafil IP (SIP) or sildenafil VO (SVO)

ANEXO 2 – CERTIFICADO DO CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 60/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Ação do sildenafil na pressão de ruptura de anastomoses em intestino delgado isquêmico**", que tem como responsável(is) **Ivana Duval de Araujo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **17/ 06/2009**.

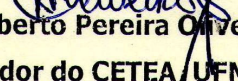
Este certificado expira-se em **17/ 06/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 60/2009**, related to the project entitled "**Effect of sildenafil upon bursting pressure of colonic anastomosis in rats with colonic obstruction**", under the supervisors of **Ivana Duval de Araujo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 17, 2009**.

This certificate expires in **June 17, 2014**.

Belo Horizonte, 23 de Junho de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 3 – PLANILHAS DE DADOS

Animal	Grupo	Peso pré-operatório	Peso pós-operatório	% de perda de peso
9	obs	330	280	15,15
10	obs	320	280	12,15
11	obs	320	300	6,25
12	obs	320	300	6,25
14	obs	340	300	11,76
16	obs	340	340	0
25	sip	350	260	25,71
26	sip	230	220	4,35
28	sip	290	260	10,34
29	sip	290	260	10,34
31	sip	280	260	7,14
33	svo	280	250	10,71
35	svo	260	240	7,70
37	svo	300	270	11,11
38	svo	360	240	33,30
39	svo	350	310	11,43
40	svo	250	210	16,00

Animal	Grupo	Fístula	Estenose	Pressão de ruptura (mmHg)
9	obs	ausente	I	150
10	obs	ausente	I	100
11	obs	ausente	0	170
12	obs	ausente	I	180
14	obs	ausente	I	150
16	obs	ausente	0	180
25	sip	ausente	0	180
26	sip	ausente	I	180
28	sip	ausente	0	290
29	sip	ausente	0	300
31	sip	ausente	0	300
33	svo	ausente	0	240
35	svo	ausente	0	220
37	svo	ausente	0	200
38	svo	ausente	I	200
39	svo	ausente	0	220
40	svo	ausente	0	220

Animal	Grupo	Inflamação	PMN (média por campo)	Angiogênese
9	obs	Moderada	42,6	Moderada
10	obs	Leve	43,0	Moderada
11	obs	Leve	30,2	Moderada
12	obs	Moderada	48,2	Moderada
14	obs	Leve	35,7	Moderada
16	obs	Leve	44,0	Moderada
25	sip	Leve	34,9	Acentuada
26	sip	Leve	38,6	Moderada
28	sip	Moderada	18,8	Acentuada
29	sip	Moderada	56,5	Acentuada
31	sip	Leve	63,4	Moderada
33	svo	Leve	48,5	Moderada
35	svo	Moderada	52,1	Moderada
37	svo	Moderada	65,5	Moderada
38	svo	Moderada	55,2	Moderada
39	svo	Leve	60,5	Leve
40	svo	Moderada	29,6	Moderada

Animal	Grupo	Colágeno (média de fibras por campo)	Colágeno jovem (média de fibras por campo)	Colágeno maduro (média de fibras por campo)
9	obs	27	13	14
10	obs	25	8	17
11	obs	24	8	16
12	obs	30	8	22
14	obs	15	5	10
16	obs	31	9	22
25	sip	28	9	19
26	sip	27	10	17
28	sip	30	4	26
29	sip	36	10	26
31	sip	32	9	23
33	svo	24	6	18
35	svo	30	14	16
37	svo	33	11	22
38	svo	20	6	14
39	svo	29	8	21
40	svo	30	12	18

ANEXO 4



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **JOÃO LUIS OLIVEIRA GUSMÃO DE ANDRADE** nº de registro 2010656371.

Às quatorze horas do dia 05 de setembro de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DO CÓLON OBSTRUÍDO DE RATOS APÓS USO DE SILDENAFIL TÓPICO OU ORAL”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e a Oftalmologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Profa. Ivana Duval Araújo, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Ivana Duval Araújo/Orientadora

Instit: UFMG Indicação: aprovado

Prof. Marcelo Dias Sanches

Instit: UFMG Indicação: aprovado

Prof. Alberto Schanaider

Instit: UFRJ Indicação: aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado

aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de setembro de 2012.

Profa. Ivana Duval Araújo/Orientadora

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Alberto Schanaider

Prof. Marcelo Dias Sanches/Coordenador

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Marcelo Dias Sanches
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia
Faculdade de Medicina UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

ANEXO 5



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Ivana Duval Araújo, Marcelo Dias Sanches e Alberto Schanaider aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DO CÓLON OBTURADO DE RATOS APÓS USO DE SILDENAFIL TÓPICO OU ORAL”**, apresentada pelo mestrando **JOÃO LUIS OLIVEIRA GUSMÃO DE ANDRADE** para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 05 de setembro de 2012.

Profa. Ivana Duval Araújo/Orientadora

Orientador

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Alberto Schanaider